FACULTE MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 4/4

RECHERCHES
SUR
LE MÉCANISME BIOCHIMIQUE
DE
L'OSSIFICATION "IN VITRO"

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
Le juillet 1943
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Guy H. DELTOUR
Né le 18 Janvier 1919, à Paris.
Docteur en Pharmacie
Licencié ès Sciences,
Ancien Moniteur de Chimie biologique à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Marseille.

Examinateurs de la Thèse
MM. J. ROCHE, *Président.*
NICLOUX, *Prof. Fac. Méd. Strasbourg.*
MORIN, *Professeur.*
P. DUBOULOZ. *Professeur.*
Assesseurs.

LONS-LE-SAUNIER
MAURICE DECLUME, IMPRIMEUR-ÉDITEUR.
1943

FACULTE MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N°

RECHERCHES
SUR
LE MÉCANISME BIOCHIMIQUE
DE
L'OSSIFICATION "IN VITRO"

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
Le juillet 1943
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Guy H. DELTOUR
Né le 18 Janvier 1919, à Paris.
Docteur en Pharmacie
Licencié ès Sciences,
Ancien Moniteur de Chimie biologique à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Marseille.

Examinateurs de la Thèse
MM. J. ROCHE, *Président.*
NICLOUX, *Prof. Fac. Méd. Strasbourg.*
MORIN, *Professeur.*
P. DUBOULOZ. *Professeur.*
Assesseurs.

LONS-LE-SAUNIER
MAURICE DECLUME, IMPRIMEUR-ÉDITEUR.
—
1943

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL *Assesseur :* F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, COTTE, AUBARET

Chargé de cours honoraire : TIAN.

Secrétaire : J. COMTE *Bibliothécaire :* Mme PEROL.

Professeurs :

Anatomie	N...
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses	ROGER
Clinique médicale	AUDIBERT
Clinique médicale	MONGES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	BREMOND
Clinique urologique	CHAUVIN
Histoire naturelle	N...
Histologie	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie chirurgicale	MOIROUD
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie	VIGNOLI
Physiologie	MORIN
Physique	CHEVALLIER
Thérapeutique	POINSO
Professeur sans chaire	POURSINES
Professeur sans chaire	DUBOULOZ
Professeur sans chaire	SAUTET

Chargés de cours :

Clinique dermatologique	VIGNE
Hydrologie thérapeutique	PIERI

Agrégés en exercice :

MM. BERTHIER	MM. CHOSSON	MM. AUDIER
BALANSARD	DELPHAUT	DOR
BRAHIC	R. IMBERT.	RECORDIER
FIGARELLA	PAILLAS	SALMON
ARNOUX		

Chargés des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale	DERRIEN
Physiologie	DONNET

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique	SALMON
Chimie minérale	ARNOUX
Chimie organique	DUMAZERT
Clinique de la tuberculose	BERTHIER
Clinique des maladies contagieuses	PERIOT
Clinique chirurgicale infantile	R. IMBERT
Clinique stomatologique	ACHARD
Clinique gynécologique	FIGARELLA
Médecine opératoire	DOR
Microbiologie (Pharmacie)	BOYER
Neuro-Chirurgie	ARNAUD
Obstétrique	CHOSSON
Pharmacodynamie (Pharmacie)	DELPHAUT
Psychiatrie	ALLIEZ
Toxicologie	GUILLOT

A MES PARENTS.

A MON FRÈRE.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE.

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.
PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE.

A Monsieur le Professeur René FABRE.

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.
PROFESSEUR DE TOXICOLOGIE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
ET A L'INSTITUT D'HYGIÈNE INDUSTRIELLE ET DE MÉDECINE DU TRAVAIL
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS.
PHARMACIEN EN CHEF DU GROUPE HOSPITALIER NECKER - ENFANTS MALADES.

A Monsieur le Professeur Lucien de GENNES.

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS.
MÉDECIN DES HÔPITAUX.

A Monsieur le Docteur Pierre ROLLAND.

ANCIEN CHEF DE LABORATOIRE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS.
LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE ET DE LA FACULTÉ.
PHARMACIEN.

A MON JURY DE THÈSE.

PREMIÈRE PARTIE.

Introduction.

Le squelette des vertébrés a été longtemps considéré comme une sorte de charpente de l'organisme, et l'on ne voyait en lui qu'un appareil de soutien et de protection des muscles et des viscères. L'étude clinique, puis biochimique, de l'évolution du système osseux et de ses états pathologiques a permis de se rendre compte que le squelette est lui-même un ensemble d'organes en perpétuelle transformation. Etudiant chez le Rat le métabolisme de l'isotope radio-actif $_{15}P^{32}$ du phosphore, Chievitz et Hevesy [22] ont observé que, chez l'adulte, environ 30 p. 100 du phosphore radioactif fixé dans le squelette sont mobilisés en vingt jours. Aussi la formation du système osseux et son entretien amènent-ils à considérer l'unité physiologique du squelette et son état dynamique. Le développement et le maintien de l'intégrité de l'os sont sous la dépendance de nombreux facteurs externes et internes. Il importe donc d'abandonner la conception statique pour étudier les échanges biochimiques continuels qui se font entre l'os et les autres organes pour assurer sa formation, sa croissance, et sa nutrition.

Un tel problème ne peut être envisagé, ni recevoir de solution, que si l'on se fait une idée claire du mécanisme de la formation de la substance osseuse. Or, celui-ci n'est pas entièrement élucidé.

Le présent travail est consacré à l'étude de la genèse du « sel de l'os », étape importante de la constitution des pièces squelettiques. Avant d'en définir l'objet, nous exposerons l'état actuel de nos connaissances sur ce sujet, afin d'en faire mieux ressortir les lacunes.

I. — *LA COMPOSITION DE LA SUBTANCE OSSEUSE EN GÉNÉRAL.*

Malgré leur diversité de structure histologique et anatomique, les os présentent entre eux une analogie de composition chimique remarquable. Essentiellement, l'os est formé d'une « matrice protéique conjonctive sur laquelle sont fixés des sels » (Policard et Roche).

A. — Le support protéique.

Il existe peu de travaux modernes sur cette question. C'est un tissu conjonctif constitué principalement par des protéines renfermant surtout de l'osséine. A côté de l'osséine, on a isolé une osséomucoïde et un « osséo-albuminoïde ». L'os ne contient que très peu ou pas de glycogène en comparaison avec le cartilage épiphysaire.

L'osséine, produit brut de la déminéralisation des os par séjour prolongé dans des solutions chlorhydriques, est un mélange de protéines mal définies dont la principale est celle qui est transformée industriellement en gélatine (*). Sa composition élémentaire est : C = 50,0, N = 18,0, S = 0,7, H = 2,0 p. 100. Une analyse de sa teneur en certains acides aminés, dont Monsieur le Professeur Roche a bien voulu nous communiquer les résultats, a fourni les indications suivantes (p. 100 de la protéine) : Arginine = 5,24, Histidine = 0,34, Lysine = 4,37, Cystine = néant, Phénylalanine = 2,01, Tyrosine = 1,07, Tryptophane = néant, Valine = 2,90, Leucine = 4,30.

On y trouve en outre du glycocole, de l'alanine, des acides glutamique et aspartique, de la proline et de l'oxyproline. C'est, du fait de sa carence en tryptophane et en cystine, peut-être en d'autres acides aminés, une matière protéique inapte à couvrir le besoin azoté.

B. — Le complexe minéral de l'os.

La partie minérale de l'os, objet de nombreuses recherches, est complexe. Différents auteurs ont essayé de l'assimiler à

(*) Le fait que la gélatine est également préparée à partir de la peau traduit bien la nature conjonctive des protéines osseuses.

un sel défini, mais ce sel est sujet à des nombreuses et profondes variations de constitution.

Deux éléments s'y trouvent en majorité : le calcium et le phosphore. Ils sont accompagnés de radicaux carboniques, de métaux en proportions moindres tels que le magnésium, le potassium, le sodium, de métalloïdes tels que le chlore, le fluor, qui ont été mis en évidence par l'étude spectrographique des cendres (Lowater et Murray [**66**]). Le calcium constitue 36 p. 100 de la partie minérale, le phosphore 16 p. 100, le radical carbonique 3 p. 100, le sodium et le magnésium respectivement 0,5 p. 100. Le tableau I ci-dessous, emprunté à Gabriel [**35**], résume la composition de la partie minérale de certains os et des dents.

TABLEAU I. — *Composition de la partie minérale des os et des dents* (Gabriel) (*p. 100 du poids des cendres*).

Constituant	Fémur d'Homme	Fémur de Bœuf	Dent de Bœuf
CaO	51,31	51,28	50,76
MgO	0,77	1,05	1,52
K_2O	0,32	0,18	0,20
Na_2O	1,04	1,09	1,16
H_2O de cristallisation	2,46	2,33	2,21
P_2O_5	36,65	37,46	38,88
CO_2	5,86	5,06	4,09
Cl	0,01	0,04	0,05
F	0,23	0,30	0,10
H_2O de constitution	1,32	1,37	1,27
Total	99,97	100,16	100,24

Outre l'aperçu que donnent ces résultats sur la complexité de la substance minérale de l'os, ils mettent en évidence la parenté qui existe entre la composition de l'os et celle de la dent. Le calcium et le phosphore sont combinés sous forme de dépôts phosphocalciques divers. Avant d'essayer de les définir, nous adopterons la désignation de ces composés sous le nom, de « sel de l'os », emprunté aux écoles allemandes et anglaises.

Quelles sont les combinaisons moléculaires qui existent entre calcium et phosphore ? Sommes-nous en présence d'un sel défini, ou bien les proportions de calcium et de phosphore sont-elles variables ? L'examen du tableau II montre que la valeur

du rapport : P/Ca n'est pas identique à celle que l'on trouve pour le phosphate tricalcique.

TABLEAU II. — *Composition centésimale de la partie minérale des vertèbres de divers animaux* (Morgulis).

Animal	Teneur p. 100 en				
	Ca	Mg	K	P	CO_2
Roussette..	37,00	0,58	0,44	16,70	3,23
Maquereau.	36,74	0,76	0,20	17,42	2,79
Grenouille.	36,09	0,72	0,44	16,45	4,67
Crapaud...	36,62	0,61	0,36	16,15	4,11
Tortue.....	35,68	0,62	0,98	14,88	5,63
Poulet.....	37,24	0,51	—	16,40	5,50
Lapin.....	36,25	0,53	0,92	15,99	5,71
Vache.....	36,05	0,74	0,85	16,43	4,58
Chien.....	35,66	0,46	1,87	15,56	5,62
Cobaye....	35,43	0,75	—	15,78	5,03

Le sel de l'os donne un rapport égal à 0,45 alors que le phosphate tricalcique donne 0,51.

Quelles sont les principales formes possibles du sel de l'os ?

1. Mélange de $(PO_4)_2\ Ca_3$ et $CO_3\ Ca$.
2. PO_4CaH.
3. Carbonato-apatite : 3 $Ca_3\ (PO_4)_2$. $CaCO_3$.
4. Hydroxy-apatite : 3 $Ca_3(PO_4)_2$. $Ca(OH)_2$ et CO_3Ca.
5. Mélange d'apatites : 3 $Ca_3(PO_4)_2$. CaX, où X = $(OH)_2$, Cl_2, SO_4, CO_3, F_2, etc...

Holt, La Mer et Chown [45] admettent que le phosphore est combiné au calcium dans le rapport du phosphate tricalcique. De même J. Bogert et Baird-Hastings [16] pensent que la totalité du radical carbonique existe à l'état de carbonate de calcium, et la totalité du magnésium à l'état $(PO_4)_2\ Mg_3$, de sorte que le calcium résiduel est fixé au phosphore résiduel dans les proportions du phosphate tricalcique. Celui-ci se formerait aux dépens de phosphate monocalcique apparaissant primitivement (Shear et Kramer [106]). Normalement le phosphate monocalcique devrait se retrouver à l'analyse ; or, il n'a pas été mis en évidence par Morgulis [73], qui réfute cette hypothèse en faisant remarquer que l'incinération du phosphate monocalcique devrait donner du pyrophosphate qui

se transformerait en orthophosphate par hydrolyse. L'expérience montre qu'il se forme directement de l'orthophosphate.

Parmi les essais poursuivis en vue de résoudre ce problème, les plus significatifs sont sans doute ceux de Morgulis [73]. Cet auteur, reprenant en la perfectionnant l'ancienne méthode de Gabriel, prépare la matière minérale de l'os et des dents en portant ceux-ci à 230 degrés dans du glycérol sec additionné de 20 p. 100 de potasse. Toute la partie organique des pièces se dissout alors, et l'on obtient un résidu ayant la forme des os et des dents et constitué uniquement par leur partie minérale. Or, celle-ci renferme, chez l'animal adulte, du calcium et du phosphore dans un rapport très voisin de celui des apatites. Mais l'expérience a montré qu'il n'en est plus ainsi lorsque l'on s'adresse à des os en voie de formation. Ettori, Benoit, Grangaud et Clavert [28], étudiant l'ossification folliculinique du Pigeon, Roche et Mourgue [99] étudiant les os et les dents d'embryons de Mouton ont pu obtenir par la méthode de Morgulis des préparations dans lesquelles le rapport : Ca/P correspondrait à des mélanges de phosphates di- et tricalciques. Tout se passe donc comme si PO_4CaH se formait primitivement, et se transformait ensuite *in situ* en $(PO_4)_2\ Ca_3$, puis peut-être en apatites.

Sous quelle forme se trouve le calcium non combiné au phosphore ? Klement [57] et Morgulis [73] émettent l'hypothèse que le calcium non lié au phosphore existe sous forme d'hydroxyde de calcium $Ca\ (OH)_2$,et, bien que rejetant l'idée d'une structure cristalline définie de l'os, Morgulis pense que la composition en est : $Ca[Ca_3(PO_4)_2]_6(OH)_2$.

Klement base son hypothèse sur l'expérience suivante : si on agite du phosphate monocalcique avec une solution tampon de carbonate de sodium à 37° pendant plusieurs semaines, il s'établit progressivement un équilibre tel que la phase solide correspond à un corps dont la formule a été indiquée plus haut, et qui est celle du « phosphate semibasique », accompagné de petites quantités de carbonate de calcium.

Hoppe-Seyler [47], Holt, La Mer et Chown [45, 46], Bogert et Hastings [16], Gassmann [37] pensent que le calcium résiduel est sous forme de carbonate de calcium. Celui-ci est difficile à mettre en évidence, le carbonate de calcium et le phosphate tricalcique s'ionisant en même temps, et les radicaux pouvant se remplacer mutuellement lorsque le sel de l'os est mis en solution.

Le sel de l'os a-t-il une constitution fixe ou variable ? Howland, Mariott et Kramer [48], soumettant des Rats à un régime rachitigène constatent que la valeur du rapport: $\frac{PO_4Ca_3}{CO_3Ca}$ diminue considérablement. De même, d'autres expériences de Brooke, Smith et Smith [17], Shear et Krammer [105], Holt, La Mer et Chown [46] tendent à prouver que le complexe minéral de l'os n'a pas une composition constante. Nous y reviendrons lorsque nous examinerons la labilité du sel de l'os.

D'autres biochimistes considèrent le sel de l'os comme un complexe stable. Certains, comme Hoppe-Seyler [47], Werner [118], Gassmann [37], Robison [86], Bogert et Hastings [16] considèrent le complexe phospho-carbonato-calcique comme appartenant au groupe des apatites naturelles dont la formule générale est : CO_3Ca, n $Ca_3(PO_4)_2$. Bogert et Hastings proposent cette formule dans laquelle n serait très voisin de 2. Brooke, Smith et Smith pensent que n est égal à 2,5, tandis que Hoppe-Seyler et Werner lui donnent une valeur égale à 3.

Ces auteurs admettent que ce complexe existe sous forme microcristalline. De Jong, Taylor et Sheard en étudiant les indices de réfraction aux rayons X d'os séchés, de l'émail dentaire et de carbonato-apatites naturelles, les rapprochent de la dahlite, $CO_3Ca.\ (PO_3)_4\ Ca_3$, et de la podolite $CO_3Ca.\ 3\ (PO_4)_2\ Ca_3$. Morse, Hastings et Roseberry [74] confirmèrent ces résultats grâce à l'étude du spectre de diffraction aux rayons X. Les résultats cadrent avec l'hypothèse de la structure microcristalline du complexe de l'os, mais aucun auteur n'est catégorique sur le choix de n. De sorte que l'on peut supposer qu'il existe un mélange de ces apatites. La plus importante serait la carbonatoapatite et les autres ne dériveraient que par substitution de CO_3Ca par $Ca\ (OH)_2$, $Ca\ F_2$, $Ca\ Cl_2$.

Garcia [35] émet l'hypothèse que le sel de l'os peut être un complexe tout en étant le siège de variations de composition. Enfin Wellman, Marek et Urbanyi [117] étudiant la constitution du sel de l'os, rejettent l'idée d'un complexe, et admettent que le phosphate tricalcique et le carbonate de chaux existent à l'état de mélanges et non de combinaisons stables et définies.

Toutefois Dallemagne et Brasseur [26] reprenant en 1942 l'étude des indices de réfraction et des spectres de diffraction aux rayons X de pièces osseuses, d'apatites naturelles et de

mélanges de $(PO_4)_2\ Ca_3$ et de $CO_3\ Ca$, réfutent de la manière la plus absolue les conclusions tirées des travaux antérieurs. Ils estiment, à la suite d'un très important ensemble de recherches, qu'il n'est pas possible de distinguer le spectre du sel de l'os de celui d'un mélange de phosphate tricalcique et de carbonate de calcium, et expliquent les erreurs d'interprétation de leurs devanciers. Aussi ne peut-on plus affirmer aujourd'hui, comme il paraissait possible de le faire avant ce travail, que le sel de l'os est constitué par une ou plusieurs apatites. Ce qui, selon Dallemagne et Brasseur semble le plus probable, est que l'os contient du phosphate tricalcique, $3\ (PO_4)_2Ca_3$, 2 HOH et du carbonate de calcium, lesquels se transforment en carbonatoapatite par chauffage à 900 degrés.

II. — *MÉCANISME DE LA FORMATION DE LA SUBSTANCE OSSEUSE.*

A. — Données déduites de l'observation biochimique des diverses étapes de la formation de l'os.

1. Modifications du support protéique.

Au point de vue histologique, la production d'une substance fondamentale préosseuse est postérieure à la transformation des ostéoblastes en cellules osseuses. Elle apparaît dans tout processus d'ossification, qu'il soit conjonctif comme pour les os du crâne, ou enchondral comme pour les épiphyses des os longs.

Policard [121] distingue dans la transformation du cartilage en tissu osseux les phases suivantes :

1. Accroissement du cartilage sérié.
2. Dégénérescence hypertrophique des cellules cartilagineuses.
3. Calcification accentuée et rapide des travées de substance fondamentale qui sépare les séries cellulaires.
4. Réhabitation par un tissu conjonctif vasculaire de la matrice cartilagineuse calcifiée.
5. Formation de lamelles osseuses sur la matrice calcifiée.
6. Remaniement de l'os primitif et construction des travées d'os spongieux.

Les premiers stades sont caractérisés par un œdème et des modifications successives de la colorabilité, traduisant des remaniements des protéines osseuses. Puis le tissu protéique se différencie suivant des fibres qui constituent des travées préosseuses. Ces travées s'organisent en réseaux englobant les ostéoblastes. Certains auteurs comme Gegenbaur, Studnicka, Retterer, Waldayer [38] admettent que l'ostéoblaste sécrète cette substance. D'autres considèrent la substance préosseuse comme dérivant du tissu protéique intercellulaire. Quoiqu'il en soit, la biochimie du support protéique de l'os est très mal connue, ce qui vient en grande partie de la difficulté que présente son étude analytique. Il semble bien cependant que ce substrat protéique ait une grande importance dans la formation de l'os, et la propriété des protéines de fixer sélectivement les ions calcium et phosphorique paraît primordiale.

Il est plus aisé de mettre en évidence l'enrichissement ou l'appauvrissement du tissu osseux en matières minérales au cours d'un déséquilibre de ces constituants, que de se rendre compte si la matrice protéique présente des variations quelconques de constitution préludant aux diverses transformations successives du tissu osseux et à leur pathogénie. Chez des animaux ayant subi des régimes provoquant des déséquilibres en sels, on n'a constaté jusqu'à maintenant aucun changement appréciable de la partie protéique, les observations faites ne pouvant, bien entendu, rendre compte que de phénomènes grossiers.

2. Apport des éléments minéraux, et intervention de la phosphatase.

Considérons le phénomène de l'ossification au moment où le substrat protéique commence à fixer les éléments minéraux. Le calcium et le phosphore se trouvent dans le sang et dans la lymphe interstitielle à l'état d'ions, de combinaisons protéiques, ou compris dans des molécules indissociées. On a constamment un équilibre entre le phosphate de calcium dissous et le phosphate de calcium précipité. Il existe donc une phase solide en équilibre avec une phase liquide. La concentration des molécules dissoutes étant constante, la précipitation du sel de l'os est régie par le produit de solubilité $S = [PO_4]^2 \times [Ca^{++}]^3$.

De nombreux auteurs admettent que le sérum est saturé en sels de calcium. Klinke [122] réfute la théorie de la saturation

en se basant sur les faits suivants : 1. Le carbonate de calcium additionné en substance n'a aucun effet sur le taux de calcium du sérum, même après longue agitation. 2. L'observation de la direction de migration des ions calcium par électrodialyse d'un ultrafiltrat privé d'albumine montre qu'une grande partie du calcium se dirige vers l'anode. 3. Une sursaturation proprement dite ne peut avoir lieu qu'avec un sel entièrement ionisé. A ce point de vue on peut admettre que le sang contient des ions et des molécules en solution, et que les uns et les autres peuvent venir au contact de la matrice conjonctive de l'os.

Brull, Larson et Tufts [18] ont établi qu'une partie des phosphates sanguins existe sous forme colloïdale, non diffusible. Donc, comme le font remarquer Policard et Roche [82], la lymphe interstitielle baignant les os reçoit du sang des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}, et aussi des complexes phosphorés et calciques pouvant être fixés par simple adsorption.

Sans nous étendre sur l'étude de la phosphatase, qui sera poursuivie plus loin, notons que cet enzyme, découvert en 1923 par Robison, a été considéré par cet auteur comme un facteur local d'enrichissement du milieu en ions $PO^{\equiv}_4$. En effet, la phosphatase de l'os, probablement sécrétée par les ostéoblastes, est capable d'hydrolyser *in situ* les esters phosphoriques, et spécialement les glycéro- et hexosemonophosphates, pour libérer des ions $PO^{\equiv}_4$. La lymphe interstitielle au contact de l'os deviendrait alors saturée en ions $PO^{\equiv}_4$, ce qui, pour Robison, amènerait la précipitation du sel de l'os.

L'activité phosphatasique « *in vivo* », est sans doute en rapport avec un équilibre endocrinien, et spécialement avec le taux de parathormone. Page [78] admet que le pourcentage de phosphatase diminue dans les os lorsque l'on injecte de l'extrait parathyroïdien à l'animal, alors que Bodansky et Bakwin [13] ne notent aucun changement. Reprenant ces recherches, Roche et Filippi [96] ont observé que, dans la plupart des cas, l'injection d'hormone parathyroïdienne provoque une augmentation de l'activité phosphatasique des os chez le Pigeon et chez le Rat, augmentation paraissant en rapport direct avec l'ostéolyse déclanchée par l'hormone.

Nous aurons l'occasion d'étudier le mode d'action de cette hormone lorsque nous envisagerons les facteurs humoraux, endocriniens et vaso-moteurs, qui conditionnent la physiologie normale et pathologique du système osseux.

3. Fixation des ions Ca^{++} et $PO^{\equiv}_4$.

La question de la fixation du calcium et du phosphore est très complexe, car il s'agit de déterminer si ces éléments se fixent électivement sur la matrice conjonctive de l'os et du cartilage, ou s'ils y arrivent combinés préalablement entre eux dans des proportions définies.

Selon György et Freudenberg [34], les protéines du cartilage interviendraient dans le dépôt du sel de l'os suivant le schéma :

a) Protéine + Ca → Protéinate de calcium.

b) Protéinate de calcium + phosphate → phospho-protéinate de calcium.

c) Phospho-protéinate de calcium → phosphate tricalcique ↓ + protéine.

Cette hypothèse est basée sur l'expérience de Pfaundler [79] : un fragment de cartilage articulaire frais plongé dans une solution de $CaCl_2$, fixe Ca (jusqu'à 50 p. 100) sans diminution notable du taux du chlore. Un cartilage identique plongé dans une solution de PO_4Na_2H à un pH convenable ne présente aucune fixation importante de $PO^{\equiv}_4$. Si le cartilage est plongé dans $CaCl_2$ puis dans $PO_4\ Na_2H$, il y a fixation de $PO^{\equiv}_4$. Donc le calcium semble être fixé préalablement et permettre une combinaison ultérieure des ions phosphoriques.

Cependant Pfaundler admet une adsorption par les protéines, « substances calcaffines » (Kalksalzfänger). D'autre part, Roche et Mourgue [99] dans leurs recherches sur les ébauches osseuses et les dents embryonnaires ont mis en évidence l'enrichissement net en phosphore de la matrice protéique au début du processus de calcification. Le rapport : Ca/P traduit alors la présence d'un fort excès de $PO^{\equiv}_4$ par rapport à la quantité qui pourrait s'unir au calcium présent pour former du phosphate tricalcique. En ceci, les observations histologiques, purement qualitatives, de Crétin [25] semblent confirmées. Benjamin [9, 10] ne fait intervenir dans la calcification que le phénomène physique de l'adsorption. En effet, l'étude de l'ultra-filtrat sanguin a permis de mettre en évidence plusieurs complexes phosphocalciques. Ces complexes pourraient être adsorbés sur le substrat protéique à mesure de leur passage à travers les capillaires sanguins, ce qui suppo-

serait un équilibre entre les concentrations des complexes dans le plasma et dans la lymphe interstitielle.

La deuxième question importante qui se pose, est la définition de la nature du sel de l'os formé, et éventuellement des étapes de sa formation.

En première approximation, on admet que le précipité qui se forme « *in vitro* » sur le stroma des cellules en voie d'ossification, semble être le phosphate tricalcique. Si CO_3NaH est présent, il se forme un complexe du groupe des apatites, de formule générale $3\ (PO_4)_2\ Ca_3 . CO_3Ca$, où (CO_3) peut être remplacé par un radical divalent, ou deux radicaux monovalents. En solution neutre, le premier précipité formé peut être $PO_4\ CaH$ lequel se transforme peu à peu en phosphate tricalcique (Ettori, Benoit, Grangaud et Clavert [28]). Du reste, de très sensibles variations de composition des sels de calcium précipités ont été observées suivant leur mode de précipitation (Klement [57], Gassmann [37]).

La formation primitive de phosphate tricalcique de l'os semble probable à la suite de récentes observations. D'une part Benoit, Ettori et Grangaud [11], étudiant l'ossification folliculinique chez le Pigeon ont observé que le rapport : Ca/P est intermédiaire à celui de $PO_4\ CaH$ et de $(PO_4)_2\ Ca_3$ dans le sel de l'os préparé selon Morgulis. Il en est de même selon Roche et Mourgue dans les pièces squelettiques embryonnaires avant l'apparition de nodules de calcification importante.

Logan et Taylor [**61**, **62**, **63**], dans une série d'expériences très élégantes sur la solubilité du sel de l'os comparée à la solubilité des différents complexes phospho-calciques, ont cherché un parallélisme entre le mécanisme de la formation de ces deux séries de sels. Si le sel de l'os se forme en plusieurs étapes, le précipité obtenu en premier lieu adsorberait par la suite des ions supplémentaires contenus dans la phase liquide en contact. La concentration des ions Ca^{++} et $PO^{\equiv}_4$ nécessaire pour former le sel de l'os, dépend du mode de précipitation. Du reste, Shear et Kramer [**106**] démontrent que le produit ionique $[Ca^{++}]^3$ et $[PO^{\equiv}_4]^2$ n'explique pas la composition des précipités de phosphate de calcium observés. En effet, c'est le produit $P \times Ca$, ou ce qui revient au même $[PO^{\equiv}_4].\ [Ca^{++}]$ et non $[PO^{\equiv}_4]^2.\ [Ca^{++}]^3$ qui régit la formation du sel de l'os « *in vitro* ». Tout se passe donc comme si le sel primitif était $PO_4\ CaH$.

En vue de serrer de plus près le problème de la calcifica-

tion, Logan [65] étudiant la composition des cartilages, de l'os, de la dentine, et de l'émail des dents, conclut que les bases inorganiques se trouvent à l'état de carbonates et de phosphate tricalcique, et que — fait important — la calcification commence au niveau du cartilage par une concentration des bases dans le liquide interstitiel. Reprenant ces travaux avec Taylor en 1937, Logan démontre par des expériences effectuées « *in vitro* » sur du sel de l'os artificiel, que le complexe phosphocalcique ne peut précipiter que si le produit ionique augmente.

Ces auteurs remarquent que les précipités de phosphate de calcium obtenus de pH = 7 à 7,4 dans des solutions contenant du bicarbonate de sodium, adsorbent des ions Ca^{++} et $CO^{=}_{3}$ de la solution en contact, même lorsque le produit $[Ca^{++}]. [CO^{=}_{3}]$ est inférieur au produit de solubilité de CO_3 Ca, et que ce phénomène se retrouve avec de la poudre d'os.

Logan et Kane [**60** *bis*] mettent de petits fragments d'os (1 mg. par litre) pulvérisés dans différents sérums humains et animaux et constatent que leur concentration en calcium et en phosphates minéraux ne diminue pas sensiblement. Cependant, si la quantité de solide augmente, les concentrations en Ca^{++} et $PO^{=}_{4}$ du sérum diminuent. En conclusion de leurs expériences, Logan et Taylor, suivant les variations du produit de solubilité $[Ca^{++}]^3. [PO^{=}_{4}]^2$ avec des quantités de sel de l'os, ou de phosphate tricalcique en équilibre « *in vitro* » avec une solution contenant des ions $PO^{=}_{4}$ et Ca^{++}, constatent que le produit ionique $[Ca^{++}]^3. [PO^{=}_{4}]^2$ augmente, tandis que la quantité de sel de l'os en équilibre avec la phase liquide décroît au-dessous de 150 mg. par litre. Si le sel de l'os était uniquement formé de molécules venant de l'union simultanée des ions, le produit de solubilité du sel obtenu à partir des solutions sursaturées serait le même quelle que soit la quantité de phase solide en équilibre avec la phase liquide. De même, l'enrichissement progressif des précipités en $CO^{=}_{3}$ et en Ca^{++} est parallèle au fait observé par Hugounenq (1900) que les os d'animaux âgés sont plus riches en carbonates que les os des animaux jeunes, en tenant compte de ce que la transformation est beaucoup plus lente « *in vivo* » que « *in vitro* ».

De toutes ces hypothèses il faut retenir que le phénomène de la *calcification n'est pas un phénomène physico-chimique simple, comportant uniquement la précipitation du sel de l'os,* et que la complexité même de son mécanisme permet de concevoir sa réversibilité dans des conditions physiologiques.

4. Labilité du sel de l'os, et évolution de l'os en général.

Le système osseux est en perpétuelle évolution et subit des modifications de constitution chimique aussi bien physiologiques que pathologiques. Les variations physiologiques normales ont fait l'objet d'un ensemble de recherches dues à A. Roche et Garcia [93], A. Roche, J. Roche et Marcelet [91], J. Roche et Mourgue [98]. Ces auteurs ont montré que le squelette ne se calcifie pas d'une manière continue, mais que l'ossification se fait en trois temps. D'abord la partie protéique se développe sensiblement plus que la partie minérale. Dans un second stade la minéralisation l'emporte, mais la croissance n'est pas achevée. L'étape finale est caractérisée par une calcification intensive, la croissance étant alors terminée. Les expériences

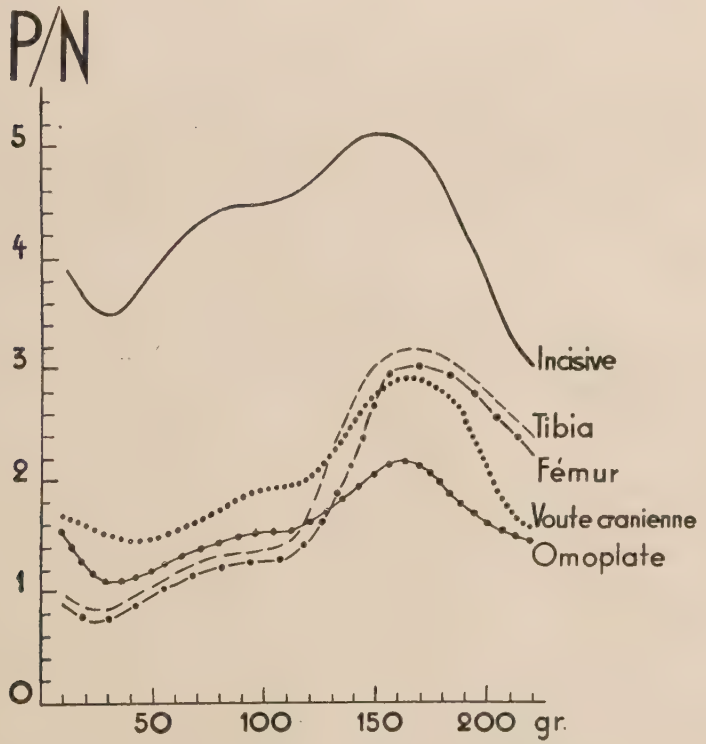

Figure 1. — *Variations du rapport : phosphore/azote (P/N), du fémur et du tibia en fonction du poids des animaux (Rats).*

Abscisses = poids des animaux (grammes), Ordonnées = rapport : P/N (d'après A. Roche, J. Roche et Marcelet [**91**]).

utilisées pour mettre ces faits en lumière furent effectuées sur des rats blancs, et l'étude des variations de la teneur en azote montre que celle-ci passe de 9 p. 100 chez des animaux jeunes (d'une dizaine de grammes), à 5 p. 100 chez les adultes. Par contre, le taux du phosphore croît et la courbe de ses variations marque un palier (9 p. 100) caractérisant le stade préadulte. Le rapport : P/N suit sensiblement les variations de la teneur en phosphore. La période d'ossification enchondrale, s'étendant jusqu'au stade préadulte, correspondrait à l'organisation du tissu osseux fondamental. Celle-ci une fois terminée, il se formerait un nouveau dépôt de sels qui seraient mobilisables (par opposition à ceux du tissu fondamental qui sont fixes) et constitueraient une réserve. Cette réserve mobile est d'une importance capitale en ce qui concerne le maintien de la constance du taux de la calcémie et de la phosphatémie.

D'autre part, Howland, Mariott et Kramer [48] ont montré que l'administration d'un régime rachitigène à des rats diminue la valeur du rapport P/Ca en fonction de la teneur en phosphore inorganique de la ration. Gusmitta [40] avait aussi noté l'abaissement du taux des carbonates pour un régime pauvre en sels. En 1932, Irving et Chute [51] démontrèrent la mobilisation du carbonate de chaux chez des animaux soumis à un régime acidogène. Un régime riche en fluorine amène aussi un changement dans la composition des os (Mac Clure et Mitchell [67]). Brooke, Smith et Smith [17] étudiant le métabolisme minéral de rats soumis à un régime pauvre en sels, virent la constitution d'une réserve minérale par l'os, dans lequel le rapport : phosphate/carbonate, augmente. Mais ces régimes déminéralisés ne provoquent pas un affaissement immédiat du taux du calcium et du phosphore sanguin, ce qui prouve bien la présence d'un mécanisme régulateur. De même les différentes maladies osseuses telles que : le rachitisme, la maladie de Paget, l'ostomalacie, l'ostéose parathyroïdienne, la tuberculose osseuse, les ostéosarcomes, et les affections de l'appareil dentaire relèvent de troubles du métabolisme de la réserve minérale. Jung [53], citant Bauer, Albright et Aub, affirme à la suite de ses expériences que l'os nouvellement formé est extrêmement labile, et que c'est surtout le tissu spongieux de la métaphyse qui est résorbé en quantité lorsqu'il y a de grandes pertes en sels de chaux, telles que l'on en observe à la suite d'administration de parathormone.

Ceci nous amène à envisager très brièvement les facteurs exogènes et endogènes qui peuvent, au cours de la vie d'un individu, modifier l'évolution de son système osseux.

L'étude détaillée des relations physiologiques et physiopathologiques qui lient le squelette avec le reste de l'organisme sortirait du cadre de cet exposé ; aussi, nous bornerons-nous à énumérer très rapidement quelques-uns des facteurs alimentaires, humoraux, endocriniens et vasomoteurs les plus importants connus jusqu'à maintenant, sans entrer dans la discussion encore obscure de leurs mécanismes d'action.

Pour que le système osseux conserve son intégrité, il faut évidemment un apport constant minimum fourni par l'alimentation. Mais cette quantité minima de calcium indispensable à un équilibre calcique satisfaisant, doit s'accompagner de certaines conditions. En particulier le régime doit comprendre des vitamines, dont les plus importantes à cet égard, sont indiscutablement les vitamines D et C (Mellanby [72], Lehnartz [60]). Mais leur action est liée à la composition des aliments, et entre autres, à la valeur du rapport : Ca/P, dans ceux-ci. (A. Roche [90], Mouriquand, Leulier et A. Roche [75]). L'action de ces deux vitamines est très différente. D'une étude d'ensemble récente, Roche et Martin-Poggi [100] concluent que l'acide ascorbique est indispensable à la formation et à la conservation du stroma protéique des os, mais n'exerce pas d'action directe sur leur calcification.

Rominger [104], Howland et Kramer [49] et surtout Nicolayssen [77] admettent que la vitamine D agit directement sur l'absorption intestinale du calcium. Pour Brull [19], cette vitamine agit de la même manière sur l'absorption intestinale du phosphore. Enfin de nombreux auteurs, et en particulier Nicolayssen [77], Roche et Marcelet [95], admettent qu'à l'action intestinale, s'ajoute une action proprement « squelettique », puisque l'architecture osseuse est très notablement influencée par l'administration de vitamine D. Roche et Mourgue [98] ont mis en évidence l'importance de cette vitamine dans le ravitaillement en Ca et P des cals de fracture, où elle améliore la calcification sans hâter la consolidation.

Considérons rapidement les facteurs endogènes de régulation des échanges calciques et spécialement le rôle des secrétions internes.

De nombreuses glandes endocrines semblent avoir une influence plus ou moins marquée sur le système osseux : thy-

roïde, thymus, glandes génitales, surrénales, hypophyse ; mais le rôle prépondérant est certainement dévolu aux parathyroïdes.

On sait que l'hypoparathyroïdie conduit à des troubles hypocalcémiques, tels que la tétanie, la spasmophilie, accompagnées accessoirement d'alcalose. Au contraire, l'hyperparathyroïdie amène des dystrophies osseuses très importantes telles que l'ostéose parathyroïdienne (maladie de Recklinghausen) où le calcium osseux semble solubilisé en grand excès et éliminé. Cependant, on observe alors, comme dans les cas d'hypervitaminose D, des calcifications anarchiques des artères, des reins, de la vésicule biliaire, etc...

En ce qui concerne les glandes génitales, la folliculine semble avoir une influence assez marquée sur la calcification. Benoit, Clavert, Ettori et Grangaud [11], procédant à des injections répétées d'hormones génitales femelles sous forme de benzoate ou de propionate d'oestradiol, à des canards et à des pigeons, voient se former un os médullaire « folliculinique » plus minéralisé que l'os ancien. Il se constitue ainsi une réserve en sels calciques, mais, après un certain temps (3 mois), l'os néoformé présente une décalcification partielle spontanée malgré la continuation des injections d'hormone.

Ces expériences sont intéressantes à rapprocher des syndromes cliniques d'hyperfonctionnement et d'hypofonctionnement testiculaires, étant donnée la grande analogie de constitution chimique que présentent les hormones mâles et femelles. Dans les cas de castration double d'origine infectieuse, chirurgicale ou traumatique chez l'individu encore impubère, dans les cas d'eunuchoïdisme ou de cryptorchidie, on observe une très longue persistance des cartilages de conjugaison. L'enfant castré grandit de manière disproportionnée, surtout des membres inférieurs (« Homme-Araignée »), alors qu'au contraire, les enfants atteints de macrogénitosomie restent petits, deviennent massifs, par suite de la calcification prématurée de leurs cartilages d'accroissement.

Enfin, au point de vue humoral, signalons entre autres facteurs l'influence considérable de l'acidose (Blum, Delaville, van Caulaert [12]).

Ce court aperçu des différents ordres de facteurs susceptibles de modifier la formation, la croissance et l'entretien du système osseux, montre combien l'étude de l'ossification « *in vivo* » est complexe. Aussi, a-t-il paru à de nombreux auteurs

et à nous-mêmes plus efficace d'envisager provisoirement ce phénomène plus délimité qu'est la calcification « *in vitro* » afin de serrer de plus près ultérieurement le processus véritable de l'ossification.

B. — Ossification « *in vitro* » et phosphatase des os.

L'étude de l'ossification d'une pièce squelettique présente des difficultés considérables, tenant au fait que les territoires en voie d'ossification y sont toujours assez limités et enclavés dans des zones calcifiées. En effet, dans un cartilage de conjugaison par exemple, dès que les travées se développant vers la face diaphysaire de la bande cartilagineuse sont aptes à se calcifier, elles se chargent de sels, tandis que, dans les couches cellulaires sus-jacentes, le cartilage sérié demeure mou mais ne peut servir d'objet d'étude, car il ne s'ossifie pas.

Aussi a-t-on pensé que la calcification « *in vitro* » réalisant un processus lent, que l'on peut suivre au niveau de coupes d'organes, doit permettre d'étudier avec fruit le mécanisme de la calcification osseuse. Dans le domaine biochimique, Robison et ses collaborateurs, Macleod, Soames, et surtout Miss A. Rosenheim, puis Shipley, Howland et Kramer, ont mis à profit ce fait et poursuivi sur l'ossification « *in vitro* » des recherches qualitatives d'un grand intérêt que nous nous sommes proposés de reprendre à l'échelle quantitative. Il convient que nous en exposions les résultats.

Les premiers essais de calcification « *in vitro* » furent entrepris par Robison et ses collaborateurs dans le but de mettre en évidence le rôle dans l'ossification de l'hydrolyse des esters phosphoriques par la phosphatase. Quelles sont nos connaissances actuelles sur cet enzyme ?

1. La phosphatase des os (*).

Existence et répartition. — Cette diastase est très répandue dans la nature, et se retrouve chez tous les vertébrés : chez les poissons téléostéens et sélaciens [13], les reptiles [115], les oiseaux [15, 24] et les mammifères.

Dans les os longs d'animaux jeunes, la phosphatase se ren-

(*) On trouvera une mise au point d'ensemble sur ce sujet dans : J. Roche [**103**] la phosphatase des os, in : Exposés annuels de biochimie médicale, t. III, 251 p., 1 vol., Masson et Cie Editeurs, Paris, 1942.

contre dans les zones où la calcification s'opère rapidement [68, 87]. D'après de nombreux auteurs, elle serait secrétée par les ostéoblastes, mais on la trouve dans les os longs, dans les zones d'ossification métaphysaires, le cartilage hypertrophique, moins dans le tissu spongieux, et pas du tout dans le cartilage hyalin [83]. On la trouve aussi dans les cals d'os fracturés, spécialement pendant la phase préliminaire à la « prise » du cal (Roche et Martin-Poggi [100]).

La phosphatase des os est une phosphomonoestérase A_1 de la classification de Folley et Kay [32]. Son pH optimum est de 9,0, et elle hydrolyse plus rapidement le β- que l'α-glycérophosphate. On la trouve non seulement dans le système osseux, mais aussi dans le cerveau, le foie [2], les glandes mammaires, l'intestin (Roche et de Laromiguière [58]), les leucocytes et les hématies (Roche et Bullinger [97]) et dans le sérum (Kay et Robison [55]).

Facteurs modifiant l'activité phosphatasique.— A. *Le pH.* — Le pH optimum de la phosphatase des os est de 9,0, et la stabilité de cette diastase est maxima dans une zone comprise entre pH = 7 et pH = 8. D'après Belfanti, Contardi et Ercoli [7, 8], une faible acidité du milieu inhibe la phosphatase A_1 des os.

B. *La température.* — L'optimum de température est voisin de 42°5 ; au delà d'une certaine limite la chaleur dénature le support protéique, et provoque l'inhibition de l'enzyme.

C. *Activateurs spécifiques.* — *a*) L'ion Mg^{++} : Erdtman [27], Kay [54], Jenner et Kay [52], Cattaneo, Gabrielli et Scoz [20], Cedrangolo et del Regno [21], considèrent l'ion Mg^{++} comme un activateur de la phosphatase A_1. Jenner et Kay ont trouvé qu'il existait une concentration optima comprise entre M/1.000 et M/500 provoquant l'activation, alors que des concentrations supérieures sont inhibitrices. Bamann [3] pense que, d'une manière générale, les desmoenzymes sont moins sensibles à l'action de Mg^{++} que les lyoenzymes, cependant que l'augmentation de l'activité des phosphatases alcalines par Mg^{++} paraît être en fonction de leur degré de purification [2]. On trouvera un exposé général de cette question dans la thèse de Laurens [59].

Quel est le mécanisme d'action de cet ion ? Les interprétations sont très diverses et très nombreuses : activation du substrat S dans une combinaison $^{-}S\ Mg^{+}$, donnant avec l'enzyme

E un composé $^{+}$E Mg S^{-} facilement dissociable [5], formation d'un complexe actif Enzyme-Magnésium [52], protection de l'enzyme contre l'effet inhibiteur des ions $PO^{\equiv}_4$ libérés par l'hydrolyse du substrat [23, 43, 56]. C'est à cette dernière hypothèse que se rallient Roche et Nguyen-van Thoai [102], en ajoutant que les sels de magnésium agissaient directement sur l'affinité des phosphatases pour leur substrat. Dans le cas de la phosphatase osseuse, cette affinité est augmentée alors qu'elle est diminuée pour les enzymes à pH optimum = 5,4. Ces auteurs pensent en outre que les modifications de l'affinité des phosphatases par Mg^{++} sont dues à un effet direct sur l'apoenzyme, tandis que l'action antagoniste de l'ion $PO^{\equiv}_4$ peut être rattachée soit à la formation d'un phosphate de magnésium, soit à une action secondaire sur un groupement spécifique de l'enzyme auquel se combinent les ions phosphoriques.

b) Autres activateurs : Ils sont peu nombreux. Les acides aminés tels que le glycocole, l'alanine, activent la phosphatase A_1 et cette action est renforcée par la présence d'ions Zn^{++} [47 *bis*]. Cloetens [23] admet l'action favorable du manganèse, alors qu'Albers [1] la met en doute. L'acide ascorbique serait activateur pour certains [114], indifférent pour King et Delory [56], pour Albers, et inhibiteur pour von Euler.

D. *Inhibiteurs spécifiques.* — Les ions $PO^{\equiv}_4$ produits de l'hydrolyse du substrat par l'enzyme, sont des inhibiteurs de l'activité des phosphoestérases [55, 92, 119, 76]. Les thiols (Pyle [84], Willams et Watson, Albers, Waldschmidt-Leitz), les oxalates [6], l'acide cholique [111], KCN [4] le sont aussi. L'action des fluorures est faible [50, 88] et réversible (dialyse) [6].

Les phosphatases alcalines des divers organes ne se comportent pas identiquement vis-à-vis des divers activateurs et inhibiteurs, et, à cet égard, la phosphatase des os paraît beaucoup plus sensible à l'action activatrice du magnésium et à l'action inhibitrice des acides biliaires et des thiols que celles du rein, du foie et de l'intestin (Laurens [59]).

2. Calcification « *in vitro* » et phosphatase.

Les expériences entreprises sur la calcification « *in vitro* » montrèrent dès l'origine l'étroite corrélation qui lie la phosphatase et l'ossification.

Afin d'étudier le rôle des esters phosphoriques dans l'ossifi-

cation, Robison [88] et ses collaborateurs, entreprirent des essais de calcification « *in vitro* ». Ces auteurs ayant remarqué que les os des animaux rachitiques ne manquaient pas de phosphatase, furent amenés à rechercher si la calcification de ces os ne pouvait se faire « *in vitro* » en les immergeant dans des solutions d'hexosemonophosphate de calcium ou d'autres esters phosphoriques hydrolysables.

Les expériences initiales portèrent sur des cartilages costaux et sur des épiphyses entières de rats rachitiques mis à macérer de 8 à 24 heures à 37°, dans des solutions 0,1 *M* d'hexosemonophosphate de calcium ou de glycérophosphate de calcium, tandis que des témoins étaient placés dans des solutions de phosphate trisodique ou de chlorure de sodium. La présence de sel de l'os nouvellement fixé était alors mise en évidence sur des coupes longitudinales fixées et colorées suivant la méthode de Kossa, au nitrate d'argent (Robison, Soames et Goldblatt [128], Fell et Robison [29, 30, 31]).

L'examen histologique de ces préparations révélait que la zône hypertrophique du cartilage se calcifiait, alors que les petites cellules du cartilage épiphysaire ne présentaient aucun changement. Bien que les conditions de macération aient été différentes des conditions physiologiques normales, la calcification s'était faite « *in vitro* » exactement où elle se fait « *in vivo* » chez un animal normal. De plus, ces essais montraient que les os des animaux rachitiques ne manquaient pas de phosphatase. A la suite de ces expériences, Robison émit une première théorie sur le rôle de la phosphatase dans la calcification. L'auteur pense que l'hydrolyse enzymatique des esters phosphoriques arrivant au contact de l'os, libère des ions $PO_4^{\equiv}$. Cet excès d'ions phosphoriques dans la lymphe interstitielle qui se trouve au contact de l'ébauche osseuse fait augmenter le produit des concentrations ioniques au point qu'il atteint et dépasse le produit de solubilité et la précipitation de phosphate tricalcique a lieu alors.

Robison [86] interprète les faits selon le schéma suivant :

Plasma sanguin.

Solution saturée de sel de l'os renfermant des esters phosphoriques.

$[PO_4^{\equiv}]^2 \times [Ca^{++}]^3 = [(PO_4)_2Ca_3] = S$: produit de solubilité.

↓

Lymphe interstitielle (au contact de l'os).

Par action de la phosphatase sur les esters phosphoriques : libération de $PO_4^{\equiv}$. Le milieu devient sursaturé en sel de l'os :

$(PO_4)_2Ca_3 > S.$

↓

Tissu calcifié.

$(PO_4)_2Ca_3$ — phase solide.

Pour confirmer cette hypothèse, Robison fait macérer des échantillons de cartilages costaux à pH = 7,2 dans des solutions contenant du calcium ionisé, du phosphate de potassium monobasique et du glycérophosphate de sodium en quantités croissantes (Martland et Robison [70, 71]. A mesure que la concentration en ions $PO_4^{\equiv}$ augmente, le dépôt de phosphate de calcium est plus important. De même, Policard, Roche, Péhu et Boucaumont [83] ont mis en évidence que le tissu préosseux en voie de calcification s'ossifie d'autant plus vite et plus intensément qu'il est plus riche en phosphatase. La région métaphysaire est la plus riche en cette diastase.

En 1924, Shipley [109] observait que des tranches fines de cartilage et d'os de rats rachitiques mises à macérer dans du sérum de rats normaux, se calcifiaient exactement comme des échantillons analogues prélevés sur des rats nourris avec un régime curatif. Peu après Shipley, Kramer et Howland [108] immergèrent des tranches de cartilage de rats rachitiques dans une solution stérile de sels minéraux (ClNa, SO_4Mg, CO_3Na) contenant des ions Ca^{++} et $PO_4^{\equiv}$ en quantités identiques à celles qui existent dans le plasma, soit 10 mg. de calcium et 4 mg. de phosphore pour 100 cm^3. La calcification se produit à ces concentrations en 9 heures environ et présente les mêmes caractères macroscopiques et microscopiques que l'ossification normale. « Le premier fait que l'on observe est la formation d'une ligne de calcification dans le cartilage proliférant, la calcification ne se manifeste pas uniformément dans une zone, mais dans de petites aires séparées par du car-

tilage non calcifié qui s'ossifie progressivement ». Ces auteurs insistent sur le fait que ce processus n'est pas une simple précipitation de sels de calcium, mais dépend de l'activité des tissus vivants. Du reste, ils observent que la calcification est retardée par la présence d'albumine et est complètement inhibée par des poisons protoplasmiques, la chaleur et le froid. Il s'agit donc là d'un phénomène physiologique, car le phosphate tricalcique se fixe sur un stroma intercellulaire de substance osseuse, et non dans le cytoplasme cellulaire. Pour eux, la calcification a lieu lorsque la valeur du rapport Ca × P est assez élevée ; elle n'a plus lieu au-dessous d'une certaine limite.

Robison et Soames (1924-1930) constatent que la calcification se produit à des concentrations en ions calcium et phosphorique plus faibles en présence d'un ester phosphorique, qu'en son absence. Plus le taux des esters est élevé, plus la précipitation augmente. Pendant l'expérience, le taux du phosphore inorganique augmente dans le liquide où le fragment cartilagineux est immergé, ce qui tient à la diffusion de la phosphatase dans le milieu.

Shipley [**109**], Holt [**45**], Kramer, Shelling et Orent [**107**], étudiant les différents facteurs pouvant modifier la calcification « *in vitro* », démontrèrent que le pH optimum était voisin de celui du sérum, que NaCl, KCl, MgCl, étaient des inhibiteurs de ce phénomène. Par contre l'acétone, l'alcool et le chloroforme n'ont que peu ou pas d'effet sur la phosphatase. Le cyanure de potassium à une concentration de 0,001 *M* inhibe la calcification dans une solution de sels inorganiques ; il est faiblement inhibiteur en présence d'esters. Le fait que le cyanure agisse à si faible concentration, montre que le processus d'ossification dépend essentiellement de l'activité cellulaire. La dessiccation du cartilage, son traitement par les solvants des corps gras, réduit son aptitude à se calcifier sans affaiblir le mécanisme phosphatasique.

Robison et Rosenheim [**89**] ont étudié l'action des protéines du sérum, l'action du glucose et celle des autres constituants organiques du sérum sur la calcification *in vitro*. Lors d'une addition de 7 p. 100 de protéines du sérum à une solution saline, il faut augmenter les taux de calcium et de phosphore pour obtenir une précipitation. C'est ainsi que la calcification à partir d'ions a lieu en l'absence de protéines pour Ca × P = 10 × 3 mg. et seulement à 10 × 6 en présence de 7 p. 100

de protéines sériques, et de 10 × 11 dans le même milieu additionné de 0,1 p. 100 de glucose. Il se forme en effet une combinaison protéine-calcium qui diminue la concentration en ions Ca^{++} de la solution ; le glucose donnerait aussi une combinaison glucose-calcium.

En ce qui concerne l'action du bicarbonate de sodium, Mac Leod et Rosenheim, au lieu de conduire les expériences dans une solution contenant 0,03 p. 100 de sels font des essais sur des solutions contenant 0,2 p. 100, ce qui est une concentration voisine de celle du sang. La calcification se fait régulièrement avec un produit : Ca × P, plus bas que dans les expériences précédentes. Ceci tend à démontrer qu'un complexe carbonato-phosphaté, dont la solubilité est inférieure à celle du phosphate tricalcique, précipite. La précipitation séparée de carbonate de calcium paraît exclue, car aucun dépôt ne se fait en l'absence de phosphate, même à des concentrations en calcium beaucoup plus fortes.

En dehors de l'étude de facteurs d'intérêt physiologique direct, tels que le taux de substances présentes dans le sérum (protéines, NaCl, CO_3NaH, etc...), Robison, Macleod et Rosenheim, et surtout Robison et Rosenheim, ont poursuivi celles d'autres corps susceptibles d'inhiber partiellement la calcification « *in vitro* ». Les premiers auteurs ont observé que la présence de KCN gêne cette dernière et, selon les seconds, les fluorures (0,00001 *M* et 0,0001 *M*), les iodacétates (0,0001 *M* et 0,001 *M*) auraient un effet inhibiteur sur la fixation du sel de l'os, mais sans agir pourtant sur l'hydrolyse phosphatasique des esters.

Ces expériences ont permis de séparer nettement, à l'échelle biochimique, des étapes de la formation de la substance osseuse, que Robison désigne sous le nom de « mécanisme ». Il écrivait dès 1930 : « les résultats de ces expériences dissocient deux mécanismes dans la calcification du cartilage hypertrophique : le mécanisme phosphatasique qui réalise dans l'humeur, par l'hydrolyse d'esters phosphoriques, une condition de sursaturation par rapport au sel de l'os ; et un second mécanisme qui favorise le dépôt du sel de l'os à partir de solutions inorganiques saturées, que la condition de sursaturation soit due à l'hydrolyse enzymatique d'esters ou à la diffusion d'une solution sursaturée. La nature de ce second facteur est inconnue. Il peut être une légère augmentation de pH des humeurs, due à l'établissement d'un équilibre de membrane —

l'affinité spécifique de certains fragments du support protéique pour le calcium ou pour un autre constituant du sel de l'os ou quelque facteur favorisant le début de la cristallisation. Le fait qu'il est inhibé par KCN à très faibles concentrations suggère l'hypothèse que l'activité des cellules y participe ».

Cette dissociation limite le rôle de la phosphatase à l'enrichissement en ions $PO_4^{\equiv}$ de l'os, et elle fait nettement ressortir que la minéralisation de l'os s'opère en dehors d'une participation directe de cet enzyme, contrairement à une opinion que trop d'auteurs ont, à tort, attribuée à Robison. Toutefois, il y a lieu de remarquer que, si la dissociation des deux « mécanismes » est hors de doute, les expériences modifiant l'aptitude du cartilage à se calcifier sans atteindre l'action de la phosphatase sont peu nombreuses et souvent d'interprétation délicate. C'est ainsi que, dans un mémoire avec Rosenheim, Robison modifie ses conclusions initiales sur l'action de KCN « fortement inhibiteur de la calcification à partir de sels, mais non en présence d'esters » (Robison et Soames) ; l'action lui paraît moins importante et parfois nulle, même lorsque la calcification s'opère à partir d'ions. Il en serait également ainsi de l'inactivation du second mécanisme par l'acétone, l'alcool, le chloroforme et la dessiccation. De sorte que ces expériences méritent d'être étendues, car on ne peut pas à leur lumière se former une opinion sur la nature du phénomène auquel préside le second mécanisme, et ceci nous paraît un point important demeuré obscur dans l'ossification.

Fell [31] avait démontré en 1926 qu'un fragment terminal d'os long d'un embryon de Poulet âgé de huit jours cultivé « *in vitro* » dans une solution calcifiante, continuait à se développer normalement et à se différencier en une partie diaphysaire contenant des cellules hypertrophiques, une partie épiphysaire contenant des cellules plus petites. Dans certains cas, l'os s'était même formé autour de la partie diaphysaire. Dans des travaux ultérieurs avec Robison, le même auteur constate que le cartilage ne présente aucune activité phosphatasique au moment de la transplantation ; l'activité enzymatique se développe *in vitro* après trois jours, et s'accroît progressivement. Ces phénomènes ne s'observent que si les cellules hypertrophiques sont présentes dans des cartilages qui s'ossifient normalement.

Cet ensemble de travaux montre toute l'importance de la phosphatase dans la calcification, mais il n'est pas certain qu'il

convienne de lui attribuer une signification physiologique directe. En effet, les résultats qu'ils apportent sont ceux obtenus sur de véritables « modèles » de zones d'ossification, et comme Roche et Mourgue ont eu l'occasion de le discuter, l'apparition de la phosphatase et l'enrichissement des os en radicaux phosphoriques — et non en phosphate tricalcique — avant la calcification dans les os embryonnaires ou les cals, témoigne d'un rôle de cet enzyme plus complexe que celui prévu par le schéma de Robison. Il n'en est pas moins vrai que l'étude biochimique de l'ossification « *in vitro* » a apporté et peut encore apporter des renseignements très utiles sur le mécanisme de la formation de la partie minérale des pièces squelettiques.

Roche et Simonot [**101**] abordant l'étude de la calcification « *in vitro* » à l'échelle quantitative par dosage de Ca^{++} et de $PO^{=}_{4}$ fixés, immergent des fragments d'os et de cartilages d'accroissement dans des solutions inorganiques contenant du calcium et des radicaux phosphoriques à la concentration de ces éléments dans le sang, et constatent que ces échantillons fixent le calcium et le phosphore dans des proportions très variables, qui ne correspondent pas à la formation d'une combinaison chimique définie, mais à la fixation spécifique de chacun. Ces essais présentaient sur les expériences de Pfaundler [**79**], de Freudenberg et György [**34**], résumées antérieurement, l'avantage qu'ils étaient effectués sur des tissus en voie d'ossification et non sur du cartilage articulaire « inerte » vis-à-vis de l'ossification.

Roche et Simonot constatent en outre que les cartilages de conjugaison, et les os métaphysaires de rats rachitiques ne fixent que des quantités minimes d'ions calciques et phosphoriques dans les conditions auxquelles des échantillons d'os normaux se calcifient bien. Ces auteurs en déduisent que l'os rachitique présente une aptitude réduite à fixer ces ions, et cela indépendamment de son activité phosphatasique puisque celle-ci est au contraire augmentée.

L'étude de l'ossification tant « *in vivo* » qu'« *in vitro* » a permis de préciser un ensemble de données importantes, mais dont on ne peut pas encore dégager avec certitude une théorie générale du mécanisme de la formation de la substance osseuse et, encore moins, le bilan des actions physiologiques qui régissent la vie du système osseux. Comme nous l'avons déjà signalé, tout progrès important dans la biochimie de l'ossification est lié à une meilleure connaissance du processus élé-

mentaire de la genèse de la substance osseuse. Or, nous ne savons encore exactement quel est le « sel de l'os » primitivement formé, comment il prend naissance, et comment il se fixe à la matrice protéique. Des faits importants sont déjà acquis, mais comment les relier les uns aux autres ?

La dualité des « mécanismes » de Robison, et le fait que le sel de l'os une fois constitué renferme du phosphate tricalcique sont les données biochimiques principales dont nous disposons actuellement. Mais comment, à partir d'elles, nous former une opinion sur l'évolution des premières étapes de la calcification ?

Les travaux de Roche et Mourgue, auxquels nous avons déjà fait appel, permettent d'envisager la récolte séparée d'ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} par la matrice protéique, par leur combinaison *in situ*. Mais les conclusions tirées de faits statiques (analyse des os au début de leur calcification) mériteraient d'être étendues par des recherches sur l'évolution de cette fixation parallèle des ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++}. Nous avons espéré apporter une contribution utile à la connaissance de tels problèmes par l'étude chimique de l'ossification « *in vitro* ».

III. — *OBJET DU TRAVAIL.*

L'ensemble des données que nous venons de résumer a fait ressortir une certaine imprécision en ce qui concerne le mécanisme intime de la calcification, et celui du maintien de l'intégrité de la substance osseuse. Nous avons entrepris ces recherches pour apporter une contribution à l'étude du premier de ces processus.

Comme nous l'avons signalé, presque toutes les recherches entreprises jusqu'ici sur l'ossification « *in vitro* » présentent un caractère qualitatif. Or, l'étude quantitative d'un tel phénomène nous paraît d'un grand intérêt. Permettant de faire des bilans de PO^{-}_4 et de Ca^{++} fixés, elle doit donner une indication utile sur l'existence de la fixation sélective de ces ions envisagée par Pfaundler, par Freudenberg et György, et par Roche et Mourgue. De ce fait, on peut espérer en tirer des données précises sur les premières étapes de la formation du sel de l'os.

Les conditions de la calcification « *in vitro* » d'un fragment osseux une fois précisées, il doit être possible de définir avec exactitude l'influence exercée sur elle par divers agents. A cet égard, les premiers essais de Robison et Rosenheim sur l'action qu'exercent divers inhibiteurs nous ont paru intéressants à reprendre.

Enfin, l'étude quantitative de la fixation de $PO_4^{\equiv}$ à partir des phosphates inorganiques et d'esters phosphoriques doit nécessairement objectiver le rôle de la phosphatase dans l'ossification « *in vitro* ».

L'objet de notre travail a été de reprendre à l'échelle quantitative l'étude de l'ossification « *in vitro* » du cartilage de conjugaison afin de définir :

1° *les modalités de la fixation des ions* $PO_4^{\equiv}$ *et* Ca^{++} *dans les premières étapes de la calcification et, éventuellement, la nature du sel de l'os primitivement formé ;*

2° *le rôle de l'enrichissement phosphatasique en ions* $PO_4^{\equiv}$ *dans la calcification des os ;*

3° *les facteurs modifiant l'affinité de la matrice protéique de l'os pour les ions* $PO_4^{\equiv}$ *et Ca en la présence ou en l'absence d'une action phosphatasique.*

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles.

Les recherches antérieures sur la calcification des os « *in vitro* » sont des essais *qualitatifs*. Robison, Fell et leurs collaborateurs contrôlaient la fixation de « phosphate tricalcique » sur des os longs d'animaux jeunes en imprégnant de nitrate d'argent, d'après la méthode de Kossa (*), des coupes d'épiphyses osseuses ayant macéré dans des solutions renfermant Ca^{++} et $PO_4^{\equiv}$ ou un ester phosphorique (**).

Il importait de reprendre *quantitativement* ces expériences afin de mettre en évidence la fixation de phosphore et de calcium, soit à l'état de combinaisons préformées, soit séparément. Dans ce cas, l'évaluation du rapport : P/Ca devait nous montrer par sa constance si l'on pouvait penser à la fixation d'un sel défini. La fixation de Ca^{++} d'une part, et celle de $PO_4^{\equiv}$ d'autre part, en fonction de temps progressifs d'immersion dans des solutions salines contenant Ca^{++} et $PO_4^{\equiv}$ aux taux de la calcémie et de la phosphatémie normales, devait nous indiquer si le rapport de la fixation du calcium à la fixation du phosphore restait constant et voisin du quotient : P/Ca, d'un sel défini.

Ce sel pouvait être soit le phosphate tricalcique, soit le phosphate bicalcique, soit la carbonatoapatite. Les rapports : P/Ca de ces différents sels sont respectivement :

$$\begin{aligned} 2\,P/3\,Ca &= 0{,}51 \text{ pour } (PO_4)_2Ca_3, \\ P/Ca &= 0{,}77 \text{ pour } PO_4CaH, \\ 6\,P/10\,Ca &= 0{,}46 \text{ pour } 3\,(PO_4)_2Ca_3.CO_3Ca. \end{aligned}$$

(*) Signalons à ce sujet la critique de Roche sur ce procédé d'identification : le nitrate d'argent signale sur les coupes la présence de radicaux PO_4, mais nullement de $(PO_4)_2Ca_3$.

(**) Les recherches de Pfaundler, de Freudenberg et György n'ont pas porté sur des régions osseuses en voie de calcification, mais seulement sur du cartilage hyalin et, de ce fait, nous ne pouvons les considérer comme apportant une contribution directe à l'étude du problème qui nous préoccupe. L'expérience a d'ailleurs montré le bien-fondé de cette opinion.

La comparaison de ces rapports théoriques avec nos déterminations expérimentales a été notre premier travail. Cependant les phénomènes de remplacement mutuel des ions $PO_4^{\equiv}$, $CO_3^{=}$, ou CO_3H^-, signalés par Logan, et les phénomènes d'adsorption de ces mêmes ions, ne nous permettront pas une interprétation précise des résultats. Cette précision sera néanmoins suffisante pour contrôler la fixation sélective de Ca^{++} et de $PO_4^{\equiv}$. Une première recherche a été réalisée dans ce sens par Roche et Simonot [**101**]. C'est son extension que nous nous sommes proposés d'entreprendre.

Dans un deuxième temps, nous avons essayé de mettre en évidence le rôle de la genèse des ions $PO_4^{\equiv}$ *in situ*. Nous savons déjà par de nombreux travaux (Robison, Roche) que la phosphatase est localisée dans les portions des os où la calcification est la plus rapide. Aussi, avons-nous mis à macérer parallèlement des échantillons de cartilage articulaire, de cartilage d'accroissement, et d'os métaphysaire nouvellement formé, afin de contrôler simultanément la présence ou l'absence de phosphatase, sa plus ou moins grande activité, et rechercher si cette activité est en rapport direct avec le dépôt de sel de l'os. Nous avons cherché à mettre en évidence le rôle de la genèse des ions $PO_4^{\equiv}$ par la phosphatase en comparant la fixation respective d'ions Ca^{++} et $PO_4^{\equiv}$ par des échantillons osseux analogues, placés dans des solutions de sels minéraux ou de glycérophosphate renfermant des quantités identiques de phosphore ($PO_4^{\equiv}$ ou esters phosphoriques) et de calcium.

Enfin, *dans une troisième série d'expériences,* nous avons essayé de modifier la fixation des deux ions en activant ou en inhibant l'affinité du support protéique par différents facteurs chimiques ne modifiant pas l'activité phosphatasique.

Cette méthode de recherche semblait devoir permettre de confirmer la fixation sélective du calcium et du phosphore, puisque le dépôt respectif des uns et des autres pourra être, *a priori,* influencé différemment par un même agent. De plus, elle peut, en montrant l'importance de la réceptivité plus ou moins grande de la matrice protéique, ouvrir une nouvelle voie d'investigation pour la définition ultérieure du rôle des protéines osseuses dans l'ossification.

Nous décrirons d'abord les techniques employées, puis les résultats des diverses séries d'expériences avant de passer à leur discussion.

I. — *TECHNIQUES GÉNÉRALES.*

A. — Matériel d'étude.

Nous nous sommes adressés aux cartilages de conjugaison des os longs des pattes postérieures — tibias et fémurs — d'embryons normaux provenant de brebis fraîchement abattues.

La structure et la fonction physiologique du cartilage de conjugaison peuvent être résumées ainsi, selon Policard [81 *bis*] :

« Le cartilage de conjugaison ou d'ossification est une as-
« sise de cartilage jeune qui coupe transversalement la tête
« des os longs, au niveau de leur plus grand diamètre trans-
« versal. Morphologiquement, à l'œil nu ou à la loupe, on peut
« y distinguer trois zônes.

« En contact avec l'os épiphysaire s'étend une assise trans-
« lucide blanc bleuâtre, homogène ou finement granuleuse,
« faite de cartilage hyalin.

« Le microscope révèle deux parties distinctes, mais ayant
« le même aspect à l'œil nu. La première ou zône de réserve
« est faite de cartilage hyalin. La seconde est caractérisée par
« des empilements de cellules très caractéristiques (cartilage
« sérié). C'est la zône de prolifération.

« Au-dessous existe une assise jaunâtre, d'aspect strié,
« comme fibreuse, et faite de cartilage calcifié et dégénéré
« (zône de calcification et de dégénérescence).

« Plus bas, séparée du cartilage calcifié par une ligne nette,
« est une assise de coloration rougeâtre renfermant de nom-
« breux vaisseaux sanguins et des cellules médullaires. C'est
« la zône d'ossification, au niveau de laquelle commence à se
« faire le dépôt osseux (zône d'ostéogenèse). Elle se continue
« par des transitions insensibles avec la couche d'os spongieux
« qui constitue la métaphyse.

« Les trois zônes du cartilage d'ossification correspondent
« à peu près à trois évènement histophysiologiques essentiels
« qui se déroulent successivement : l'accroissement du carti-
« lage dans la zône translucide, la dégénérescence du cartilage
« et sa calcification dans l'assise cartilagineuse opaque et jau-
« nâtre, la réhabitation des restes calcifiés de cartilage par

« du tissu médullaire et l'élaboration de lamelles osseuses dans « la troisième assise rougeâtre et médullaire ».

L'échantillon destiné à l'expérience est prélevé peu de temps après l'abattage (une à deux heures) et rapidement disséqué. On a soin d'éliminer tous les tissus étrangers aux tissus osseux et cartilagineux. Pour cela on enlève la gaine fibreuse de l'os, et on décortique le périoste afin d'avoir une pièce homogène. A ce moment-là, on distingue très bien, à la loupe, le *cartilage hyalin* blanc mat séparé de la diaphyse osseuse par un disque de *cartilage d'accroissement* irrigué, d'aspect rose violacé, qui épouse l'*extrémité métaphysaire* du tissu ossifié. Nous avons étudié simultanément ces trois régions osseuses, dont seules les deux dernières s'ossifient.

Il ne nous a pas été permis de définir à chaque fois l'âge des embryons étudiés, aussi nous sommes-nous bornés à en mesurer la taille prise de la pointe du museau à la base de la queue, pour donner une idée de leur degré d'évolution. Nous avons rejeté les spécimens en-dessous de 18 cm. et au-dessus de 40 cm.

Sur l'os ainsi prélevé (fémur ou tibia), on coupe alors des tranches fines à surfaces parallèles de un tiers à un demi-millimètre d'épaisseur, en ayant soin d'éliminer les échantillons susceptibles par leur position intermédiaire de contenir un tissu hétérogène. Il faut en particulier se défier des embryons trop évolués qui possèdent déjà un point d'ossification épiphysaire dans la masse cartilagineuse hyaline. Au début nous avons dû faire un contrôle histologique de l'homogénéité des fragments mis en expérience.

Les échantillons des trois zônes (cartilage hyalin, cartilage d'accroissement, os métaphysaire), ainsi isolés sont ramenés à 100 mg., puis soigneusement lavés au sérum physiologique, et rapidement épongés. D'autre part, on a placé au préalable à l'étuve à 37° des tubes bouchés contenant 10 cm^3 de la solution de Robison ; on immerge les fragments osseux et cartilagineux dans ces tubes. Le milieu est saturé de chloroforme afin d'éviter toute action bactérienne. Les expériences précédentes ont montré qu'il était nécessaire de faire des *témoins* de solubilité pour se rendre compte de la quantité de phosphore et de calcium que l'os et le cartilage cèdent au milieu. Ces témoins ont été effectués sur une solution de Robison ne contenant ni calcium, ni phosphore.

Les fragments de fémur ou de tibia sont mis à macérer pen-

dant un temps qui varie entre 2 et 16 heures à la température de 37°. Au bout de ce temps, on retire les tubes de l'étuve, on décante le liquide surnageant, on lave rapidement l'échantillon osseux ou cartilagineux avec 1 ou 2 cm³ d'eau distillée. On réunit le liquide surnageant et les eaux de lavage, et on déprotéinise par une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. Sur une partie aliquote du filtrat on dose les ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} restants. Les témoins de solubilité obtenus avec la solution inorganique sans Ca ni P nous ont donné des chiffres qui sont évidemment plus forts que ceux que l'on obtiendrait en présence de ces ions.

En effet, la mise en liberté de ces ions dépend du produit de solubilité $[PO_4^{\equiv}]^2$. $[Ca^{++}]^3$ et la composition du milieu où l'on fait macérer les fragments intervient pour déterminer sa valeur. Or, la mise en évidence de la solubilité de ces ions ne peut se faire que dans un milieu qui ne les contient pas. Il en résulte que les témoins sont un peu trop élevés. Cette lacune gêne les déterminations de la composition du sel fixé par les échantillons osseux et cartilagineux, mais permet néanmoins de donner un ordre de grandeur de l'affinité des fragments pour le calcium et le phosphore.

B. — Solution nutritive.

Nous avons utilisé dans les expériences sur la fixation des ions en milieu minéral la solution de sels inorganiques de Robison contenant les ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} au même taux que le plasma. Voici la composition de cette solution pour 100 cm³ :

Chlorure de sodium	0,90 p. 100
Bicarbonate de sodium	0,03 p. 100
Chlorure de potassium	0,04 p. 100
Sulfate de magnésium	0,025 p. 100

Pour obtenir un taux de calcium et de phosphore voisin de celui des milieux biologiques, on ajoute à cette solution 0,027 g. de chlorure de calcium pur et sec qui correspondent à 10 mg. de calcium pour 100 cm³, et 2,42 cm³ de la solution tampon de phosphate *M*/15 de Sörensen de pH = 7,38 qui apportent 5 mg. de phosphore pour 100 cm³. On observe qu'il se forme alors un léger trouble dû à la précipitation de petites quantités de carbonate de calcium. On fait dissoudre ce précipité en ajoutant 5 à 10 gouttes de ClH à 1 p. 100. Le pH prend alors une valeur plus basse, voisine de 7. On le vérifie à l'électrode

de verre. La solution ainsi préparée est ensuite titrée en calcium et en phosphore selon les techniques décrites plus bas.

Lors des expériences sur la fixation de phosphore à partir d'un ester phosphorique, on substitue du glycérophosphate de sodium (β) au mélange de phosphates contenu dans la solution de Robison.

C. — Dosage de Ca^{++} et de $PO_4^{\equiv}$.

1. Dosage du calcium dans les solutions nutritives.

Nous avons employé la méthode utilisée par Simonot [110 *bis*], qui est très voisine de celle décrite par Kramer et Tisdall.

Le principe du dosage est le suivant : le calcium est précipité à chaud à l'état d'oxalate. Le précipité est lavé plusieurs fois par centrifugation, recueilli et dissous dans l'acide sulfurique dilué à chaud. On titre l'acide oxalique libéré par le permanganate de potassium.

A partir de CO_3Ca, qui se transforme en chlorure de calcium soluble, nous avons préparé une solution contenant 2 mg. de calcium par cm^3, puis nous avons dilué cette solution au 1/50e afin de nous placer dans les conditions de concentration de nos dosages ultérieurs. La solution finale contenait alors 40 γ de calcium par cm^3.

Mode opératoire : Dans un tube à centrifuger conique on place 8 cm^3 de la solution, soit 320 γ Ca au départ ; 2 cm^3 de solution tampon acéto-acétique sont ajoutés pour ajuster le pH à une valeur comprise entre 4 et 5,5 afin d'avoir une précipitation complète de l'oxalate de calcium. On porte au bain-marie bouillant, on attend 10 minutes, puis on ajoute 1 cm^3 d'une solution saturée d'oxalate d'ammonium. On agite, et on laisse reposer 4 heures. On lave le précipité à 3 reprises par centrifugation avec une solution saturée à froid d'oxalate de calcium. On ajoute 2 cm^3 d'acide sulfurique au 1/5e. On fait dissoudre le précipité au bain-marie bouillant ; on titre à chaud avec une solution préparée extemporanément de MnO_4K *N*/100 à l'aide d'une microburette. Les résultats montrent que, l'erreur absolue commise étant au maximum de l'ordre de ± 3 γ, cette méthode de dosage pourra être appliquée à nos déterminations.

2. Dosage des ions $PO_4^{\equiv}$ dans les solutions nutritives.

Nous avons employé la méthode de Briggs - Robison effectuée au photomètre de Pulfrich. Le principe de la méthode est le suivant : les ions $PO_4^{\equiv}$ sont combinés au phosphomolybdate d'ammonium en milieu sulfurique, et celui-ci est réduit en bleu de molybdène par une solution d'hydroquinone. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la teneur en ions $PO_4^{\equiv}$ est évaluée au photomètre de Pulfrich.

Mode opératoire : Dans un tube à essai jaugé à 20 cm³ on introduit 1 cm³ d'une solution de molybdate d'ammonium à 10 p. 100 et 1 cm³ d'acide sulfurique au 1/3. On met ensuite la prise d'essai contenant les ions phosphoriques (entre 20 et 70 γ) puis on ajoute 1 cm³ d'une solution d'hydroquinone à 0,5 p. 100 contenant 10 p. 100 de bisulfite de sodium. On complète à 20 cm³ avec de l'eau distillée, on agite et on laisse la coloration se développer 20 minutes, temps au bout duquel elle est sensiblement stable. On compare ensuite au colorimètre de Pulfrich avec une courbe étalon établie au préalable. (Nous nous sommes servis du filtre n° 7).

Pour une teneur de 20 à 70 γ cette méthode donne une précision d'environ 3 p. 100.

II. — *FIXATION* IN VITRO *DES IONS $PO_4^{\equiv}$ ET Ca^{++} PAR DES FRAGMENTS CARTILAGINEUX ET OSSEUX EN PRÉSENCE DE SOLUTIONS SALINES MINÉRALES.*

La première série des expériences que nous avons poursuivies a été consacrée à l'étude de la fixation des ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} par des coupes d'os (cartilage hyalin, cartilage d'accroissement et os métaphysaire) immergées dans une solution nutritive exclusivement minérale dans laquelle le produit : Ca × P est très voisin de 50.

Les expériences ont été conduites selon le schéma général indiqué plus haut et le calcul de leurs résultats a été fait de la manière suivante :

Tous les résultats sont exprimés en γ de phosphore et de calcium par cm³ et pour 100 mg. d'échantillon.

1) *Pour le phosphore.* Désignons par A' la quantité de phosphore qui se trouve dans la solution au début de l'expé-

rience, et par R' la quantité de phosphore restant dans la solution après macération. D'autre part, les témoins de solubilité montrent que 100 mg. d'os ou de cartilage immergés dans une solution saline ne contenant ni calcium ni phosphore, libèrent une quantité T' de phosphore et une quantité T de calcium. La quantité de phosphore restant dans la solution après macération est : $B' = R' - T'$, et la quantité de phosphore fixée est : $Q' = A' - B'$.

2) *Pour le calcium.* Nous employons le même mode de calcul. Nous avons : A = quantité initiale de Ca, T = quantité de Ca solubilisée, R = quantité de Ca dosée après macération. Donc $B = R - T$, et Q (quantité de Ca fixée) $= A - B$.

3) *Rapport : P/Ca.* Le rapport : P/Ca s'obtient en faisant le quotient Q'/Q.

Ces divers calculs ne peuvent être considérés comme rigoureux, les nombreuses causes d'erreur principales étant les suivantes : tout d'abord, les tissus prélevés se sont souvent révélés hétérogènes à l'examen histologique, alors que leur structure macroscopique ne le laissait pas supposer. En effet, lors de l'apparition des points d'ossification épiphysaires au sein de la masse cartilagineuse hyaline, des éléments hypertrophiques et même des ostéoblastes qui ont une forte activité phosphatasique se trouvent disséminés. La deuxième cause d'erreur, est que la fixation des ions Ca^{++} et $PO_4^{\equiv}$ ne s'effectue qu'à la surface de l'échantillon considéré et non dans sa masse. Il sera donc important de ne mettre en expérience que des fragments dont la surface sera très semblable et aussi homogènes que possible. D'autre part, la structure alvéolaire du tissu osseux très différente de la masse hyaline et lisse du cartilage doit permettre une plus grande fixation en surface. Nous n'insisterons pas sur le témoin de solubilité, dont nous avons discuté plus haut la valeur, si ce n'est pour constater que deux fragments osseux ou cartilagineux ne libèrent pas très exactement la même quantité d'ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++}, et que nous avons été obligés de ne considérer qu'un seul témoin de solubilité par série d'expériences.

Les résultats des essais portant sur la fixation de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} dans des solutions inorganiques ont été groupés dans treize tableaux (tableaux III à XV) dans lesquels nous avons indiqué pour chaque expérience Q', Q et le rapport P/Ca.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Nos résultats expérimentaux ont été groupés dans les tableaux III à XIV.

A. — Première série d'essais : *Détermination des quantités totales de $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} fixés en une période de seize heures.*

TABLEAU III. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 1 : 32 cm.).

Temps de macération : 16 h. à 37° et à pH = 7,2.
(*Les résultats sont exprimés en γ de P et de Ca par cm^3 et pour 100 mg. d'échantillon*).

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'—T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Cartilage hyalin	2,2	40	37,8	1,2	0	97,8	97,8	1,7	0,71
	»	39	39	0	»				—
	»	39,6	37,4	1,6	»				—
	»	39	39	0	»	95	95	4,5	—
Cartilage d'accroissement.	5,3	34,5	29,2	9,8	12,2	73,8	61,6	37,9	0,26
	»	36	30,7	8,3	»	98	85,8	13,7	0,60
	»	39,3	34	5	»	88,4	76,2	23,3	0,21
	»	34,5	29,2	9,8	»	78,2	66	33,5	0,29
Os métaphysaire	8,8	32,5	22,7	16,3	12,5	83,9	71,4	28,1	0,58
	»	33,2	24,4	14,6	»	77,5	65	34,5	0,42
	»	31,6	22,8	16,2	»	83,6	71,1	28,4	0,57
	»	27	18,2	20,8	»	83,1	70,6	28,9	0,72

TABLEAU IV. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 2 : 18 cm.).

Temps de macération : 16 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération A' = 52,9 γ P par cm³ A = 101,8 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'—T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Cartilage hyalin	8,8	54,9	46,1	6,8	15	99,4	84,4	17,4	0,39
	»	57	48,2	4,7	»	100,2	85,2	16,6	0,28
	»	60	51,2	1,7	»	103	88	13,8	0,12
	»	55,7	46,9	6	»	101,8	86,8	15	0,40
Cartilage d'accroissement..	15,6	48,9	33,3	19,6	21	85,8	64,8	37	0,53
	»	50	34,4	18,5	»	—	—	—	—
	»	51,9	36,3	16,6	»	84,1	63,1	38,7	0,42
Os métaphysaire.....	17,2	45,9	28,7	24,2	12	81	69	32,8	0,74
	»	45,9	28,7	24,2	»	82	70	31,8	0,76
	»	47,9	30,7	22,2	»	86,4	74,4	27,4	0,81

TABLEAU V. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 3 : 30 cm.).

Temps de macération : 16 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 39,6 γ P par cm³ A = 97,8 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'—T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Cartilage hyalin	0	39	39	0,6	5	100	95	2,8	0,21
	»	39,6	39,6	0	»	93,4	88,4	9,4	—
	»	38,3	38,3	1,3	»	90	85	12,8	0,10
	»	39,6	39,6	0	»	83,2	78,2	19,6	—
Cartilage d'accroissement..	5,2	35,6	30,4	9,2	11,7	76,9	65,2	32,6	0,28
	»	29,5	24,3	15,3	»	73,7	62	35,8	0,42
	»	35	29,8	9,8	»	74,3	62,6	35,2	0,28
	»	34,3	29,1	10,5	»	84,2	72,5	25,3	0,41
Os métaphysaire.....	8,1	25	16,9	22,7	22,9	92,7	69,8	28	0,81
	»	32,1	24	15,6	»	86,6	63,7	34,1	0,46
	»	27,7	19,6	20	»	80,5	57,6	40,2	0,50
	»	34,1	26	13,6	»	83,8	60,9	36,9	0,37

TABLEAU VI. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryons N^{os} 5 et 5 *bis* : 38 cm.).

Temps de macération : 16 h. à 37° et à pH = 7,2.

Solution de macération : A' = 44,7 γ P par cm^3 A = 101,7 γ Ca par cm^3.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'—T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Cartilage hyalin	1,5	46,2	44,7	0	5	106	101	0,7	—
	»	40	38,5	6,2	»	100,6	95,6	6,1	1,02
	»	39,6	38,1	6,6	»	106,7	101,7	0	—
	»	47,5	46	0	»	106,7	101,7	0	—
	»	46	44,5	0,2	»	101,7	96,7	5	0,04
Cartilage d'accroissement	1,6	33,1	31,5	13,2	7,5	90,2	82,7	19	0,69
	»	29,1	27,5	17,2	»	—	—	—	—
	»	31,8	30,2	14,5	»	85	77,5	24,2	0,60
	»	31	29,4	15,3	»	86,5	79	22,7	0,67
	»	31	29,4	15,3	»	87,3	79,8	21,9	0,70
Os métaphysaire	3,7	37,7	34	10,7	12	94,9	82,9	19,8	0,57
	»	36,1	32,4	12,3	»	85,5	73,5	28,2	0,44
	»	35,2	31,5	13,2	»	85,5	73,5	28,2	0,47
	»	38,4	34,7	10	»	86,7	74,7	27	0,37
	»	37,7	34	10,7	»				

TABLEAU VII. — *Fixation in vitro de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 7 : 50 cm. et N° 8 : 25 cm.).

Temps de macération : 16 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 44,7 γ P par cm^3 A = 103,2 γ Ca par cm^3.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'—T'	Q'=A' B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Embryon N° 7.									
Cartilage hyalin	0	44,7	44,7	0	0	102,8	102,8	0,4	—
	»	44,7	44,7	0	»	103,2	103,2	0	—
	»	43,7	43,7	1	»	100,6	100,6	2,6	0,38
	»	44,7	44,7	0	»	103,2	103,2	0	—
Cartilage d'accroissement.	1,3	31,3	30	14,7	10				
	»	32,1	30,8	13,9	»	84	74	29,2	0,48
	»	36	34,7	10	»	78,8	68,8	34,4	0,29
	»	31,1	29,8	14,9	»	83,3	73,3	29,9	0,50
Os métaphysaire	2,8	38,5	35,7	9	11,7	88,9	77,2	26	0,35
	»	39,5	36,7	8	»	80,5	68,8	34,4	0,23
	»	33,7	30,9	13,8	»	76,5	64,8	38,4	0,36
	»	38.2	35,4	9,3					
Embryon N° 8.									
Cartilage hyalin	0	44,7	44,7	0	0	93,2	93,2	10	—
	»	44,2	44,2	0,5	»	99,1	99,1	4,1	0,12
	»	44,7	44,7	0	»	93	93	10,2	—
Cartilage d'accroissement.	3	30,1	27,1	17,6	0	80,6	80,6	22,6	0,78
	»	30,9	27,9	16,8	»	67,2	67,2	36	0,47
	»	30	27	17,7	»	73	73	30,2	0,58
Os métaphysaire	3,6	31,6	28	16,7	16,4	87,2	70,8	34,2	0,49
	»	34,6	31	13,7	»	87,4	71	32,2	0,43

TABLEAU VIII. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 9 : 40 cm. et N° 10 : 18 cm.).

Temps de macération : 16 h. à 37° et à pH = 7,2.

Solution de macération :

Embryon N° 9 : A' = 44,7 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³

Embryon N° 10 : A' = 44,7 γ P par cm³ A = 103,2 γ Ca par cm³

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T_4	R'	B'=R'—T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Embryon N° 9.									
Cartilage hyalin	0	44,5	44,5	0,2	0	95	95	5	0,04
	»	44	44	0,7	»	88,7	88,7	11,3	0,06
	»	43,3	43,3	1,4	»	98	98	2	0,70
Cartilage d'accroissement..	5,2	24,7	19,5	25,2	8,4	88,7	80,3	19,7	1,28
	»	29,4	24,2	20,5	»	87,4	79	21	0,97
	»	29,4	24,2	20,5	»	87,4	79	21	0,97
Os métaphysaire.....	12,5	36,5	24	20,7	14,6	78,5	63,9	36,1	0,57
	»	35,2	22,7	22	»	86,1	71,5	28,5	0,77
	»	37,3	24,8	19,9	»	83,9	69,3	30,7	0,65
Embryon N° 10.									
Cartilage hyalin	0	43,7	43,7	1	0	90,5	90,5	12,7	0,08
	»	43,1	43,1	1,6	»	85	85	18,2	0,09
	»	44,7	44,7	0	»	86,2	86,2	17	—
Cartilage d'accroissement..	4	29,3	25,3	19,4	5	82,4	77,4	25,8	0,68
	»	31,6	27,6	17,1	»	84,4	79,4	23,8	0,72
	»	30,1	26,1	18,6	»	82,4	77,4	25,8	0,72
Os métaphysaire.....	5,7	32,6	26,9	17,8	3,5	80,4	76,9	26,3	0,68
	»	32,5	26,8	17,9	»	82,7	79,2	24	0,74
					»	84,9	81,4	21,8	

B. — Deuxième série d'essais : *Fixation progressive de $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} au cours d'une période de seize heures.*

TABLEAU IX. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 12 : 40 cm.).

Temps de macération : 2 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'−T'	Q'=A'−B'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	0	50	50	0	0	101	101	0	—
	»	52	52	»	»	103	103	»	—
Cartilage d'accroissement	0	50	50	0	0	102	102	0	—
	»	47	47	3	»	96,5	96,5	3,5	0,86
Os métaphysaire	0	48	48	2	0	100	100	0	—
	»	48	48	2	»	102	102	0	—

TABLEAU X. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 12 *bis* : 40 cm.).

Temps de macération : 4 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'−T'	Q'=A'−B'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	0	52	52	0	0	101	101	0	—
	»	51	51	0	»	104	104	0	—
Cartilage d'accroissement	0	45	45	5	0	94	94	6	0,83
	»	45	45	5	»	92	92	8	0,62
Os métaphysaire	0	46	46	4	3	95	92	8	0,50
	»	45	45	5	»	92	89	11	0,45

TABLEAU XI. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 14 : 30 cm. et embryon N° 15 : 32 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 52 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'−T'	Q'=A'−B'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	0	52	52	0	0	103	103	0	—
	»	51	51	0	»	99,3	99,3	0,7	—
	»	48	48	2	»	98	98	2	1
Cartilage d'accroissement..	4,5	51,5	47	5	3,5	100	96,5	3,5	1,43
	»	51	46,5	5,5	»	92,4	88,9	11,1	0,49
	»	49,5	45	7	»	93	89,5	10,5	0,66
	»	45,5	45,5	6,5	2	93,7	91,7	8,3	0,78
	»	47	47	5					
Os métaphysaire.....	4,5	49	4,5	7,5	3,5	95	91,5	8,5	0,88
	«	51,5	47	5	»	91	87,5	12,5	0,40
	»	49	44,5	7,5	»	91,5	88	12	0,62
	»	45,3	45,3	6,7	4,3	96,6	92,3	7,7	0,87
	»	45,2	45,2	6,8	»	96,3	92	8	0,85

TABLEAU XII. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 16 : 35 cm.).

Temps de macération : 8 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 102 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'—T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Cartilage hyalin	0	53	53	0	0	96	96	6	—
	»	48	48	2	»	96,5	96,5	5,5	0,36
	»	48	48	2	»	96	96	6	0,33
Cartilage d'accroissement..	7	47,5	40,5	9,5	3,5	99	95,5	6,5	1,46
	»	47,5	40,5	9,5	»	91,5	88	14	0,68
	»	50,5	43,5	6,5	»	94,5	91	11	0,59
Os métaphysaire.....	8,5	47,5	39	11	3,5	87,5	84	18	0,61
	»	50	41,5	8,5	»	93	89,5	12,5	0,58
	»	52	43,5	6,5	»	93	89,5	12,5	0,52

TABLEAU XIII. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 17 : 35 cm.).

Temps de macération : 10 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 102 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'—T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Cartilage hyalin	0	51	51	0	0	96,5	96,5	5,5	—
	»	50	50	0	»	94,5	94,5	7,5	—
	»	47,5	47,5	2,5	»	96,5	96,5	5,5	0,45
Cartilage d'accroissement..	8,5	46	37,5	12,5	3,5	87,5	84	18	0,69
	»	48,5	40	10	»	89	85.5	16,5	0.60
	»	47,5	39	11	»	94,5	91	11	1
Os métaphysaire.....	8,5	47,5	39,0	11,0	4.5	94,2	86,4	15,3	0,78
	»	44,5	36,0	14,0	»	93	85,5	16,5	0,84
	»	48,6	40,1	9,9	»	94	86,5	15,5	0,63

TABLEAU XIV. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 18 : 42 cm.).

Temps de macération : 12 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 102 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'— T'	Q'= A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A—B	
Cartilage hyalin	0	50	50	0	3,5	97,5	94	8	—
	»	48	48	2	»	97,5	94	8	0,25
	»	47	47	3	»	99,5	96	6	0,50
Cartilage d'accroissement..	0	39,5	39,5	10,5	9,5	89,9	80,4	21,6	0,49
	»	41,5	41,5	8,5	»	91,5	82	20	0,42
	»	39,7	39,7	10,3	»	93,9	84,4	17,6	0,58
Os métaphysaire.....	2				5,8	88,2	82,4	19,6	0,46
	»	42,3	40,3	9,7	»	87,5	81,7	20,3	0,48
	»	40,4	38,4	11,2	»	85,3	79,5	22,5	0,50

TABLEAU XV. — *Fixation* in vitro *de* $PO^{\equiv}_4$ *et de* Ca^{++} *par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 19 : 40 cm.).

Temps de macération : 14 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 102 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca				P/Ca
	T'	R'	B'=R'-T'	Q'=A'—B'	T	R	B=R—T	Q=A-B	
Cartilage hyalin	0	52	52	0	0	94	94	8	—
	»	45	45	5	»	96,5	96,5	5,5	0,91
Cartilage d'accroissement..	5	43,2	38,2	11,8	5	83	78	24	0,49
	»	42	37	13	»	89	84	18	0,72
Os métaphysaire.....	3,5	41,9	38,4	11,6	7	87	80	22	0,53
	»	37,5	34	16	»	86,2	79,2	22,8	0,70

Somme toute, malgré les différences individuelles existant entre les divers embryons, les résultats présentent une homogénéité satisfaisante, en sorte que leur discussion pourra être utilement entreprise plus loin.

Cette série d'expériences a donc atteint le but proposé, à savoir : l'étude parallèle de la fixation de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} par diverses régions de l'os, à partir de solutions salines. Elle constitue le « témoin » des expériences faites en présence d'esters phosphoriques.

III. — *FIXATION* IN VITRO *DES IONS* $PO_4^{\equiv}$ *ET* Ca^{++} *PAR DES FRAGMENTS CARTILAGINEUX ET OSSEUX DANS DES SOLUTIONS DE GLYCÉROPHOSPHATE.*

Ces expériences ayant pour principal objet d'étudier la fixation de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} dans un milieu renfermant du glycérophosphate de sodium comme unique source de phosphore, nous avons dosé parallèlement le degré d'hydrolyse de l'ester par l'action de la phosphatase et la quantité de phosphore

fixée. Les solutions de macération utilisées contiennent du glycérophosphate et des ions calcium à une concentration voisine de celle de la phosphatémie et de la calcémie normales, et, dans son ensemble, le mode opératoire de ces essais est analogue à celui des expériences effectuées sur les solutions de sels organiques.

La solution nutritive est à nouveau la solution de Robison, dont la composition a été donnée plus haut, à laquelle nous avons ajouté du β-glycérophosphate de sodium et du chlorure de calcium en quantités convenables.

Pour obtenir un taux de 100 γ Ca par cm³, nous avons ajouté à 100 cm³ de liqueur 0,027 g. de chlorure de calcium pur et sec. Pour le phosphore, nous avons dissous 0,0494 g. de β-glycérophosphate de sodium dans 100 cm³ de la solution de Robison. La solution finale contient alors 100 γ Ca ionisé, et 50 γ P sous forme de glycérophosphate, par cm³. On ajoute quelques gouttes de chloroforme ou de toluène pour éviter toute fermentation bactérienne. On titre alors le calcium et le phosphore.

Dosage de Ca et de P combinés. — Le dosage du calcium a été effectué par la méthode de Kramer et Tisdall décrite plus haut pour les essais sur les solutions minérales.

Le dosage du phosphore a été fait suivant le mode opératoire suivant : On effectue d'abord une minéralisation sulfonitrique sur une prise d'essai contenant entre 50 et 100 γ P. Pour cela, on introduit le produit dans un matras de Kjeldahl, et on ajoute 0,5 cm³ d'acide sulfurique concentré et pur, préalablement vérifié. On lave le col du matras d'un bref jet de pissette, et on place une bille de verre dans le ballon. On le met au bain de sable, et on chauffe progressivement jusqu'à ce que le liquide brunisse. On laisse alors refroidir, et on ajoute 3 à 4 gouttes d'acide nitrique. On chauffe à nouveau progressivement, et on maintient la minéralisation pendant une heure et demie. On laisse refroidir, on rince le col du ballon avec 1 à 2 cm³ d'eau distillée, puis on neutralise l'excès d'acide sulfurique par la soude, de manière à se trouver dans le milieu acide requis pour la méthode de Briggs. Il est en effet important de ne pas neutraliser complètement l'acide sulfurique en excès pour revenir ensuite en milieu acide avec 1 cm³ d'acide sulfurique à 30 p. 100. Il se forme d'assez grandes quantités de sulfate de soude qui peuvent fausser le dosage de Briggs,

comme l'a fait remarquer Lohmann. Le contenu du matras est versé dans un tube jaugé à 20 cm³, rincé trois fois avec 1 à 2 cm³ d'eau distillée, et on procède à un dosage colorimétrique comme pour les solutions minérales.

Protocole expérimental : Les échantillons sont prélevés comme précédemment, soigneusement débarassés des tissus étrangers, lavés brièvement à l'eau physiologique, essorés, pesés, et immergés dans 10 cm³ de la solution de glycérophosphate préalablement portée à la température de 37°. On ajuste alors le pH à une valeur voisine de 7,2 - 7,3 par addition au moment de l'expérience de 1 cm³ du tampon au véronal sodique de Michaëlis. Pour un pH = 7,2, ce tampon se compose de 5,54 cm³ de véronal sodique *M*/10, et de 4,46 cm³ d'acide chlorhydrique *N*/10. On a soin de faire un témoin de solubilité pour chaque série d'expériences. Pour cela, on place dans une quantité identique à celle de la solution nutritive, de la solution de Robison, ne contenant ni phosphore ni calcium, des échantillons des diverses parties de l'os, de masse et de nature identiques. On dose ensuite le calcium et le phosphore solubilisés.

Les tubes sont bouchés et placés à l'étuve à 37°. Au bout du temps de macération choisi, on décante le liquide surnageant l'échantillon, on lave le fragment cartilagineux ou osseux avec 1 cm³ d'eau distillée. On réunit l'eau de lavage et la liqueur décantée, et on défèque avec 2 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100. On filtre au bout d'une demie-heure, et on divise le filtrat en trois portions. La première sert à la détermination du calcium restant dans la solution. La deuxième sert au dosage du phosphore hydrolysé par la méthode de Briggs directe. La dernière est minéralisée, comme nous l'avons décrit plus haut, et l'on y détermine le phosphore total restant.

Calcul des résultats : Tous les résultats sont exprimés en γ de phosphore et de calcium par cm³ et pour 100 mg. d'échantillon.

Le calcium fixé se calcule comme dans le cas des solutions minérales.

Pour le phosphore, nous désignerons par A' la quantité de phosphore mise en expérience sous forme de glycérophosphate, par T' le phosphore solubilisé dans le milieu, et par M' le phosphore qui reste dans la solution après l'expérience. M' représente une quantité X' de glycérophosphate encore non

hydrolysé, plus une quantité T" de phosphore ionisé libéré par le fragment osseux. Donc Q', quantité de phosphore fixé, sera : $Q' = (A' + T') - M'$, et la quantité de phosphore hydrolysé sera : $H' = (Q' + R') - T'$.

Les résultats sont groupés en huit tableaux (tableaux XVI à XXIII), dans lesquels sont indiqués pour chaque essai, la fixation de phosphore (Q'), le phosphore hydrolysé (H'), la fixation du calcium (Q), et le rapport :

$$\frac{\text{phosphore fixé}\quad Q'}{\text{calcium fixé}\quad Q}$$

TABLEAU XVI. — *Fixation* in vitro *de* $PO^{\equiv}_4$ *et de* Ca^{++} *dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 21 : 40 cm.).

Temps de macération : 2 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm³ A = 108 γ Ca par cm³.
(*Les résultats sont exprimés en* γ *P et Ca par cm³ et pour 100 mg. d'échantillon*).

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	0	0	50	0	0	0	110	110	0	—
	»	0	51	0	0	»	108	108	0	—
Cartilage d'accroissement..	0	2,6	40,2	8,8	11,4	0	109	109	0	—
	»	2,6	40,7	8,3	10,9	»	111	111	0	—
Os métaphysaire.....	1,6	7	45,6	5	10,4	0	111	111	0	—
	»	6	44,6	6	10,4	«	107	107	1	—

TABLEAU XVII. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 22 : 30 cm.).

Temps de macération : 4 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm³ A = 110 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	0	0	54	0	0	0	111	111	0	—
	«	0	50	0	0	»	105	105	5	—
	«	0	52	0	0	»	107	107	3	—
Cartilage d'accroissement..	3,8	6,4	41,8	11	13,6	0	102	102	8	1,37
	»	7,5	41,8	11	14,7	»	113	113	0	—
	»	8,2	42,8	10	14,4	»	105	105	5	2
Os métaphysaire.....	3,8	13,9	40,3	12,5	22,6	0	102	102	8	1,56
	»	16	45,8	7	19,2	»	104	104	6	1,16
	»	—	—	—	—	»	104	104	6	—

TABLEAU XVIII. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryons N° 23 et N° 24 : 30 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 47 γ P par cm³ A = 97 γ Ca par cm³

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	2	4,6	47	2	4,6	12,6	106,9	94,3	2,7	1
	»	4,7	49	0	2,7	»	107,4	94,8	2,2	—
	1,6	1,8	51	0	0	»	113	100,4	0	—
	»	4,5	45,5	3,1	6	»	116	103,4	0	—
	»	1,7	50	0	0	»	102	89,4	7,6	—
	»	3,2	47,2	1,4	3					0,39
Cartilage d'accroissement..	6,5	15,3	40,3	13,2	22	14,6	95	80,4	16,6	0,80
	»	19,8	47	6,5	19,8	»	88,2	73,6	23,4	0,28
	3,6	9,7	37,5	13,1	19,2	»	100	85,4	11,6	1,13
	»	9,9	40,5	10,1	16,4	»	94,5	79,9	17,1	0,59
Os métaphysaire.....	7	15,3	42,8	11,2	19,5	17,7	100	82,3	14,7	0,76
	5,5	12,6	43,6	8,9	16	»	90	72,3	24,7	0,36
	»	14,7	43	9,5	18,7	»	91	73,3	23,7	0,40
	»	14.7	37,7	14,8	24	»	88	70,3	26,7	0,56

TABLEAU XIX. — *Fixation* in vitro *de* $PO^{\equiv}_4$ *et de* Ca^{++} *dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 25 : 35 cm.).

Temps de macération : 8 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 53 γ P par cm³ A = 107 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	5,6	5,6	55,6	3	3	5	101	96	11	0,27
	»	5,6	60	0	0	»	101	96	11	—
Cartilage d'accroissement..	7,5	21,4	45,3	15,2	29,1	13	100	87	20	0,75
	»	22,1	45,8	14,7	29,3	»	100	87	20	0,73
	»	20	42,5	18	30,5					
Os métaphysaire.....	7,5	22,8	43,5	17	26,3	20	93	73	34	0,50
	»	15	45,8	14,7	22,2	»	92	72	35	0,42
	»	19,2	43,5	17	28,7					

TABLEAU XX. — *Fixation* in vitro *de* $PO^{\equiv}_4$ *et de* Ca^{++} *dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 26 : 40 cm.).

Temps de macération : 10 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 53 γ P par cm³ A = 107 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	4,6	4,6	52,4	5,2	5,2					
	»	4,6	48,5	9,1	9,1					
Cartilage d'accroissement..	6,5	21,1	43,8	15,7	30,3	12	89	77	30	0,52
	»	20,4	33,3	26,2	40,1	»	91	79	28	0,94
Os métaphysaire.....	6,5	14	43,8	15,7	23,2	18	90	72	35	0,45
	»	21,8	47,5	12	27,3	»	88	70	37	0,33

TABLEAU XXI. — *Fixation* in vitro *de* $PO^{\equiv}_4$ *et de* Ca^{++} *dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 27 : 30 cm.).

Temps de macération : 12 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 47 γ P par cm³ A = 97 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	13	17,1	55	5	9,1	12,6	92,6	80	17	0,29
	»	19,5	56	4	10,5	»	96,5	83,9	13,1	0,30
	»	22,6	54,4	5,6	15,2	»	88	75,4	21,6	0,26
						»	97,6	85	12	—
Cartilage d'accroissement..	18	40	40	25	47	15	68	53	44	0,57
	»	36	38	27	45	»	66	51	36	0,72
	»	34	41,5	23,5	39,5	»	63,5	48,5	38,5	0,61
Os métaphysaire.....	15	34,9	43,4	18,6	38,5	15,3	73,6	58,3	38,7	0,48
	»	39,1	39,1	20,9	45	»	72,3	57	40	0,52
	»	38,3	45,7	16,3	39,6	»	—	—	—	—

TABLEAU XXII. — *Fixation* in vitro *de* $PO^{\equiv}_4$ *et de* Ca^{++} *dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 29 : 32 cm.).

Temps de macération : 14 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 53 γ P par cm³ A = 107 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	0	3,7	50	3	6,7	3	100	97	10	0,30
	»	3,7	43,5	9,5	13,2	»	102	99	8	1,19
						»	96	93	14	—
Cartilage d'accroissement..	7	26,7	32	28	47,7	13	77	64	43	0,65
	»	16,7	34	26	35,7	»	83	70	37	0,70
Os métaphysaire.....	18	31	35	26	49	14	74	60	47	0,55
	»	31	38,5	22,5	45,5	»	76	62	45	0,50

TABLEAU XXIII. — *Fixation* in vitro *de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} dans une solution de glycérophosphate par le cartilage hyalin, le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal.* (Embryon N° 30 : 36 cm.).

Temps de macération : 16 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 47 γ P par cm³ A = 98 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P					Ca				P/Ca
	T'	R'	M'	Q'=A'+T'−M'	H'=Q'+R'−T'	T	R	B=R−T	Q=A−B	
Cartilage hyalin	4,5	10,5	52	0	6	10	92	82	16	—
	»	10,5	48	3,5	9,5	»	94	84	14	0,25
Cartilage d'accroissement	10,5	21,5	23,8	33,7	44,7	15	64,5	49,5	48,5	0,69
	»	29,8	24,8	32,7	52	»	77,5	62,5	35,5	0,92
Os métaphysaire	11,2	28,2	32,7	25,5	42,5	10	64,5	54,5	43,5	0,58
	»	25,9	34,7	23,5	38,2	»	66	56	42	0,56

Cette série d'expériences, a, comme la première, donné des résultats assez homogènes, pour que nous puissions en discuter la signification dans un prochain paragraphe.

IV. *MODIFICATIONS DE L'AFFINITÉ DU CARTILAGE DE CONJUGAISON ET DE L'OS MÉTAPHYSAIRE POUR LES IONS $PO_4^{\equiv}$ ET Ca^{++} SOUS L'ACTION DE DIVERS FACTEURS.*

Nous avons vu que Robison et Rosenheim avaient signalé que certains corps chimiques diminuaient l'affinité du cartilage pour les sels, sans modifier l'action de la phosphatase.

Ayant mis au point un mode opératoire permettant de mesurer l'affinité de l'os pour les ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++}, nous l'avons appliqué à l'étude de ses modifications. Pour cela nous avons mis en œuvre, non seulement les fluorures et l'acide monoiodacétique comme Robison, mais encore d'autres corps pouvant participer à des équilibres d'oxydo-réduction, comme l'acide ascorbique et divers thiols.

Voici le détail de nos résultats :

TABLEAU XXIV. — *Acton de NaF sur la calcification in vitro de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal, mis à macérer dans une solution de sels minéraux.* (Embryon N° 32 : 45 cm. et N° 33 : 25 cm.).

Temps de macération :
embryon N° 32 : 6 h. à 37° et à pH = 7,2
embryon N° 33 : 16 h. à 37° et à pH = 7,2
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm^3 A = 100 γ Ca par cm^3.

(*Les résultats sont exprimés en γ de P et de Ca par cm^3 et pour 100 mg. d'échantillon*).

Zône osseuse étudiée et durée de l'essai	P			Ca		
	Témoin	+FNa M/1.000	+FNa M/10.000	Témoin	+FNa M/1.000	+FNa M/10.000
N° 32 : 6 h.						
Cartilage hyalin.....	0	0	0	0	0	0
Cartilage d'accroissement.....	10,4	2,8	3,9	8,5	6	7,5
Os métaphysaire.....	7,8	5,8	6,5	6	5	6
N° 33 : 16 h.						
Cartilage hyalin.....	3,8	3,8	4	5	0	0
Cartilage d'accroissement.....	13	6,2	9,1	14,6	13,5	15
Os métaphysaire.....	22,8	7	9,8	18	15	15,3

TABLEAU XXV. — *Action de NaF sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal, mis à macérer dans une solution de glycérophosphate.* (Embryons N° 34 : 30 cm. et N° 34 *bis* : 30 cm.).

Temps de macération :
embryon N° 34 : 6 h. à 37° et à pH = 7,2
embryon N° 34 *bis* : 16 h. à 37° et à pH = 7,2
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³.

Zône osseuse étudiée et temps de l'essai	P						Ca		
	Témoin		+FNa M/1.000		+FNa N/10.000		Témoin	+FNa M/1.000	+FNa M/10.000
	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'			
N° 34 : 6 h.									
Cartilage hyalin...	3	3	1,9	0	0	0	8,7	7	7,2
Cartilage d'accroissement...	14	12,5	11	6,5	11	8,5	8,7	6	8,7
Os métaphysaire..	20,5	13,5	18	12	16,9	12,5	18,2	12,3	14,7
N° 34 bis : 16 h.									
Cartilage hyalin...	0	0	0	0	0	0	5	5	5
Cartilage d'accroissement.	50	26,5	47	21,5	49	21	17	12	15
Os métaphysaire..	40,5	24,2	31	23	20,8	10	23,5	20,1	26

TABLEAU XXVI. — *Action de l'acide monoiodacétique M/1.000, M/2.000, M/5.000, sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal mis à macérer dans une solution de sels minéraux.* (Embryons N° 36 : 38 cm. et N° 37 : 27 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 98 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca			
	Témoin	CH_2ICOOH M/1.000	CH_2ICOOH M/2.000	CH_2ICOOH M/5.000	Témoin	CH_2ICOOH M/1.000	CH_2ICOOH M/2.000	CH_2ICOOH M/5.000
Cartilage hyalin.....	0	0	2,5	0	9	10	10	8,5
Cartilage d'accroissement	11,5	5,2	10,4	9	19,5	13,5	18	19,5
Os métaphysaire.....	7,0	3,9	7,8	7,8	12,5	8,5	10	12,5
Cartilage hyalin.....	0	0	0		0	2	0	
Cartilage d'accroissement	10,2	0	8,9		8,5	0	5,5	
Os métaphysaire	8,8	0	8		7	2	7,5	

TABLEAU XXVII. — *Action de l'acide monoiodacétique M/1.000, M/2.000, M/5.000, sur la calcification* in vitro, *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal mis à macérer dans une solution de glycérophosphate.* (Embryon N° 39 : 50 cm.).

Temps de macération : 6 à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm³ A = 100 γ Ca Par cm³.

Zône osseuse	P								Ca			
	Témoin		CH_2ICOOH M/1.000		CH_2ICOOH M/2.000		CH_2ICOOH M/5.000		Témoin	CH_2ICOOH M/1.000	CH_2ICOOH M/2.000	CH_2ICOOH M/5.000
	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'				
Cartilage hyalin	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Cartilage d'accroissement	16	6	18	6	18,7	5,3	15,7	5,3	11	4	11	12,5
Os métaphysaire.....	30	8,4	30	5,3	32	9	29	6,8	8	4,5	9	7,5

TABLEAU XXVIII. — *Action de la cystéine (chlorhydrate) M/250, M/500 et M/1.000 sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal mis à macérer dans une solution de sels minéraux.* (Embryon N° 40 : 34 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 50 γ P par cm³ A = 98 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca			
	Témoin	Cystéine M/250	Cystéine M/500	Cystéine M/1.000	Témoin	Cystéine M/250	Cystéine M/500	Cystéine M/1.000
Cartilage hyalin...	2	4,5	5,8	2	9	11	10,5	9
Cartilage d'accroissement.....	8,5	4,5	4,5	7,2	11	12,8	16,8	16,8
Os métaphysaire..	4,5	4,5	5,5	4,5	14,8	15,3	14,8	18,8

TABLEAU XXIX. — *Action de la cystéine (chlorhydrate) M/250, M/500 et M/1000 sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal mis à macérer dans une solution de glycérophosphate.* (Embryon N° 41 : 45 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P							Ca			
	Témoin		Cystéine M/250		Cystéine M/500		Cystéine M/1.000	Témoin	Cystéine M/250	Cystéine M/500	Cystéine M/1.000
	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'					
Cartilage hyalin...	1,5	0	3,5	2,8	—	3	—	8,5	7,5	8,5	7,3
Cartilage d'accroissement	18	10	12	9,2	13,6	9,5		17,5	17,8	14,5	14,5
Os métaphysaire..	21	8,8	15,3	6	14,8	9		15,8	13,3	15,8	16,7

TABLEAU XXX. — *Action de l'acide thioglycolique M/1000, M/2.000, M/5.000 sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal mis à macérer dans une solution de sels minéraux.* (Embryon N° 47 : 45 cm. et N° 48 : 40 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 48 γ P par c³ m A = 28 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca			
	Témoin	Acide thioglycol. M/1.000	Acide thioglycol. M/2.000	Acide thioglycol. M/5.000	Témoin	Acide thioglycol. M/1.000	Acide thioglycol M/2.000	Acide thioglycol. M/5.000
N° 47								
Cartilage hyalin	2	3,5	7,5	2	4,5	6,5	5	4,5
Cartilage d'accroissement	9,7	11	15	10	12	12	14	12
Os métaphysaire	7,5	7,5	8,3	7,2	6,5	8	8	7,4
	Témoin	M/500	M/1.000	M/2.000	Témoin	M/500	M/1.000	M/2.000
N° 48								
Cartilage hyalin.....	1,6	0	5	2	4,5	—	5,5	5,5
Cartilage d'accroissement	9	16,5	14	10	11	14,8	13	13,5
Os métaphysaire.....	10	12,5	10	10,5	15,5	19	18	15

TABLEAU XXXI. — *Action de l'acide thioglycolique M/1.000, M/2.000, M/5.000, sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal mis à macérer dans une solution de glycérophosphate.* (Embryon N° 49 et N° 50).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P								Ca			
	Témoin		Acide thioglycol. M/1.000		Acide thioglycol. M/2.000		Acide thioglycol. M/5.000		Témoin	Acide thioglycol. M/1.000	Acide thioglycol. M/2.000	Acide thioglycol. M/5.000
	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'				
N° : 49												
Cartilage hyalin	2,5	0	0	0	—	—	3	1	7,5	10,5	8,5	7
Cartilage d'accroissement..	18	11	22,3	20	20	10	19,5	9,5	14	15	18,8	16,4
Os métaphysaire.....	17,7	10	15,6	14	15,6	14	—	—	12,5	19	19	14,6
	Témoin		Acide thioglycol. M/500		Acide thioglycol. M/1.000		Acide thioglycol. M/2.000		Témoin	Acide thioglycol. M/500	Acide thioglycol. M/1.000	Acide thioglycol. M/2.000
N° : 49												
Cartilage hyalin	0	0	2	2	2	0	—	—	7	9	6,5	7
Cartilage d'accroissement..	20,8	10	26,3	23	23,6	19,3	18,1	10	16	18,5	16	18,5
Os métaphysaire.....	26,9	15,5	24	19,3	25,8	19,3	29,4	18	11,5	15	17	16,7

TABLEAU XXXII. — *Action de l'acide ascorbique M/500. M/1.000, M/2.000 sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal mis à macérer dans une solution de sels minéraux.* (Embryons N° 42 : 34 cm. et N° 43 : 40 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 48 γ P par cm³ A = 98 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P				Ca			
	Témoin	Acide ascorbique M/500	Acide ascorbique M/1.000	Acide ascorbique M/2.000	Témoin	Acide ascorbique M/500	Acide ascorbique M/1.000	Acide ascorbique M/2.000
N° 42								
Cartilage hyalin.....	5	5	5	—	6,5	6	6,5	—
Cartilage d'accroissement	8,2	8,5	8,8	10,8	18,5	9,5	13,5	16,5
Os métaphysaire	7,5	5	5	0	12,5	8,3	9,3	11,8
N° 43								
Cartilage hyalin.....	4	1,5	1	4	6,5	—	5	5
Cartilage d'accroissement	6,5	0,5	4	6,5	14,8	11	—	13
Os métaphysaire	6,5	0	4	1,5	11,5	5	10,5	11,5

TABLEAU XXXIII. — *Action de l'acide ascorbique M/500, M/1.000, M/2.000, sur la calcification* in vitro *de fragments de cartilage hyalin, de cartilage d'accroissement et d'os métaphysaire d'embryon de Mouton normal, mis à macérer dans une solution de glycérophosphate.* (Embryons N° 44 : 25 cm. et N° 45 : 30 cm.).

Temps de macération : 6 h. à 37° et à pH = 7,2.
Solution de macération : A' = 49 γ P par cm³ A = 100 γ Ca par cm³.

Zône osseuse	P								Ca			
	Témoin		Acide ascorbique M/500		Acide ascorbique M/1.000		Acide ascorbique M/2000		Témoin	Ac. ascorbique M/500	Ac. ascorbique M/1.000	Ac. ascorbique M/2.000
	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'	H'	Q'				
N° 44												
Cartilage hyalin.....	0	0	0	0	3	2	0	0	10	10	8	6
Cartilage d'accroissement.....	13,3	10	9,1	7	11,3	7,5	12,5	10	19,5	11	13	16,5
Os métaphysaire.....	13,9	10,2	12,5	6,5	—	—	11,3	6,5	17,3	11,3	11,3	16
N° 45												
Cartilage hyalin.....	0	0	3	1	—	—	0	0	7	5	4	10
Cartilage d'accroissement.....	14	11	12	6	12,8	8	12	9,5	13,5	11	15	15
Os métaphysaire.....	16,3	13	14,8	9	17	11	15,5	9,5	18	13	16	19

N. B. Des dosages de l'acide ascorbique contenu dans le milieu, effectués d'heure en heure, nous ont montré qu'il était pratiquement totalement oxydé à la quatrième heure de l'expérience.

V. — *EXAMEN D'ENSEMBLE ET DISCUSSION DES RÉSULTATS.*

Il convient, pour pouvoir utilement discuter nos résultats, de dégager les faits qui ressortent des données expérimentales rassemblées dans les tableaux ci-dessus.

A. — Examen d'ensemble des résultats.

Avant d'examiner l'ensemble des résultats obtenus, il est indispensable d'en fixer la précision. Deux facteurs sont à considérer pour apprécier celle-ci : d'une part la grandeur des quantités de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} libérées par les témoins, et d'autre part, la constance du phénomène étudié dans divers fragments d'une même zone osseuse. En effet, la mesure des quantités de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} fixées ne peut être faite de manière satisfaisante que si l'os ne perd pas trop de ces ions dans les milieux nutritifs et si le phénomène que nous nous sommes proposés d'étudier est assez régulier.

En ce qui concerne le premier point, nos expériences et celles de Roche et Simonot, montrent que les pertes en phosphates sont minimes, en sorte que la fixation de $PO^{\equiv}_4$ peut être étudiée sans difficulté. Quant aux pertes en Ca^{++}, généralement plus élevées, elles sont néanmoins compatibles avec les exigences de l'expérimentation. Enfin, les variations observées entre le comportement des divers fragments d'une même zone dépassent rarement 10 p. 100. Somme toute, en dehors d'un petit nombre de données aberrantes, les expériences que nous avons poursuivies ont donné des résultats exacts à 10-15 p. 100 près.

Remarquons enfin que les comparaisons que l'on fait entre les résultats obtenus sur les os de deux embryons ne peuvent pas être rigoureuses, car un hasard favorable seul permet de disposer de deux organismes au même degré de développement. Dans les séries d'essais où nous avons envisagé de telles comparaisons, nous nous sommes efforcés d'utiliser des embryons de même taille, mais nos résultats comportent néanmoins une marge d'erreur non négligeable du fait de l'inégalité dans le degré de développement des ébauches osseuses provenant de divers sujets.

Nous avons fait figurer dans les tableaux précédents (III à XXXIII) l'ensemble des chiffres obtenus, afin que l'on puisse juger objectivement de leur précision. C'est seulement pour l'établissement des moyennes (tableaux XXXIV et XXXV), que nous avons écarté certains résultats notoirement aberrants.

1. **Expériences sur la fixation globale de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} en milieu minéral en 16 heures.** — Un premier fait ressort de l'examen des données obtenues dans la première série d'expériences, à savoir : l'inégale affinité des diverses régions de la zone d'accroissement des os longs (cartilages hyalin et d'accroissement et os métaphysaire) pour les ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}.

L'examen du tableau des moyennes (tableau XXXIV) est à cet égard significatif. Que l'on examine les quantité de phosphore ou de calcium fixées en 16 heures, le cartilage articulaire apparaît toujours comme s'enrichissant beaucoup moins en ces éléments que le cartilage d'accroissement ou l'os métaphysaire. Ce dernier a toujours, mais à des degrés divers, une affinité plus grande pour le phosphore et pour le calcium que le cartilage hyalin. Cette observation peut être faite de manière constante, malgré la diversité des résultats obtenus d'un embryon à l'autre ou même sur divers fragments osseux provenant d'un même embryon, diversité que l'on peut attribuer à l'hétérogénéité du matériel étudié.

TABLEAU XXXIV. — *Valeurs moyennes des quantités de P et de Ca fixées en 16 heures à partir de solutions minérales et du rapport P/Ca.*

(Embryons de tailles très diverses, de 18 à 50 cm.).

Embryon N°s	P			Ca			P/Ca		
	Cartilage		Os métaphysaire	Cartilage		Os métaphysaire	Cartilage		Os métaphysaire
	hyalin	d'accroissement		hyalin	d'accroissement		hyalin	d'accroissement	
1 (32 cm.)	0,70	8,22	16,97	3,10	27,10	29,99	0,22	0,30	0,56
2 (18 cm.)	4,80	18,23	23,46	15,70	37,85	30,66	0,30	0,48	0,76
3 (30 cm.)	0,47	11,20	17,95	11,15	32,20	34,80	0,03	0,35	0,52
5 (38 cm.)	—	15,10	11,38	2,36	21,95	25,80	—	0,59	0,44
7 (50 cm.)	0,25	13,50	—	0,75	31,16	32,93	0,33	0,43	—
8 (25 cm.)	0,16	17,36	18,33	8,10	29,60	27,33	0,02	0,58	0,67
9 (40 cm.)	0,76	22,06	20,86	6,10	—	31,93	0,12	—	0,66
10 (18 cm.)	0,87	18,36	17,80	15,96	25,13	24,03	0,05	0,73	0,74

Un second fait apparaît nettement : *sauf dans le cartilage hyalin, qui fixe parfois en abondance Ca^{++} sans faire disparaître $PO^{\equiv}_4$ du milieu nutritif, on note un certain parallélisme de la fixation de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++}.* Mais ce parallélisme ne semble pas très étroit, pour autant que permet d'en juger le mode opératoire que nous avons adopté. La particularité de composition du cartilage articulaire fait que l'on ne peut interpréter avec précision que les résultats obtenus sur l'os métaphysaire, car les prélèvements de cartilage de conjugaison contiennent toujours une petite quantité de cartilage non ossifiable, devant fixer préférentiellement Ca^{++}, et de tissu ossifiable se calcifiant à la manière des os. Or, si l'on en excepte un petit nombre de valeurs notoirement aberrantes, entre autre celles obtenues sur l'embryon 7, toutes celles présentées par le rapport : P fixé/Ca fixé, sont comprises entre les valeurs de 0,51 (correspondant à $(PO_4)_2Ca_3$) et 0,77 (correspondant à PO_4CaH), celles déterminées sur les embryons les plus petits étant en général les plus élevées.

TABLEAU XXXV. — *Valeurs moyennes des quantités de P et de Ca fixées à divers temps de l'expérience à partir de solutions minérales et rapport : P/Ca.*

(Embryons de 35 à 42 cm.).

Heures de macération	P			Ca			P/Ca		
	Cartilage		Os métaphysaire	Cartilage		Os métaphysaire	Cartilage		Os métaphysaire
	hyalin	d'accroissement		hyalin	d'accroissement		hyalin	d'accroissement	
2	0	1,50	2,00	0	1,75	0	—	0,85	—
4	0	5,00	4,50	0	7,00	9,50	—	0,72	0,47
6	0,66	5,80	6,70	0,90	8,35	9,74	0,73	0,69	0,69
8	1,33	8,50	8,66	5,50	10,50	14,33	0,24	0,81	0,60
10	0,83	11,20	11,63	6,16	15,16	15,76	0,13	0,74	0,74
12	1,66	9,76	10,45	7,33	19.73	20,80	0,23	0,49	0,49
14	2,50	12,40	13,80	6,75	21,00	22,40	0,37	0,59	0,61
16	0,87	15,00	16,97	7,90	28,19	29,68	0,27	0,56	0,58

Si, examinant les valeurs individuelles à partir desquelles ont été établies les moyennes, on considère les séries les plus homogènes, qui sont expérimentalement les plus satisfaisantes, celles-ci sont parfois plus proches de la valeur théorique

de : P/Ca dans le phosphate bicalcique que dans le phosphate tricalcique (embryons de 18 cm.).

2. **Expériences sur la fixation progressive de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} en milieu minéral au cours d'une période de 16 heures.** — Le tableau XXXV et la figure 2 résument les résultats obtenus dans ces expériences faites sur des embryons de tailles voisines. Le cartilage articulaire se « sature » assez rapidement en ions, surtout en Ca^{++}, tandis que les autres régions osseuses étudiées fixent progressivement $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} au cours de l'expérience.

On note un *abaissement de la valeur du rapport : P/Ca en fonction du temps d'expérience,* cette valeur tendant vers celle de $(PO_4)_2Ca_3$. Tout se passe donc comme si, dans une première période, la récolte des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} se faisait dans des proportions différentes de celles dans lesquelles du phosphate tricalcique formé ultérieurement les renferme. Cette conclusion ne saurait toutefois être formulée avec fermeté, car les variations d'affinité d'un os à l'autre pour Ca^{++} et $PO^{\equiv}_4$ peuvent être considérables, le matériel utilisé n'étant ni très homogène, ni d'un degré d'évolution toujours identique. Néanmoins, dans l'ensemble, ce rapport présente des valeurs intermédiaires à celles caractérisant respectivement la formation de PO_4CaH et de $(PO_4)_2\ Ca_3$. Il est donc possible que le premier de ces sels prenne d'abord naissance, puis se transforme en le second.

3. **Expériences sur la fixation de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} à partir d'une solution contenant Ca^{++} et un ester phosphorique.** — Les résultats de ces expériences sont objectivés par l'examen du tableau XXXVI et de la figure 2.

Ils permettent de mettre en évidence l'action de la phosphatase des os dans la calcification *in vitro,* car l'hydrolyse enzymatique du glycérophosphate est alors la seule source d'ions $PO^{\equiv}_4$ à partir desquels l'os va se minéraliser. Leur signification est dégagée, d'une part de leur examen direct, d'autre part de leur comparaison avec les données acquises en présence d'ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}.

L'hydrolyse phosphatasique de l'ester n'est pas identique dans tous les essais ; le cartilage hyalin ne la provoque que très faiblement, tandis que le cartilage d'ossification et la métaphyse la réalisent activement de manière à peu près équivalente, comme l'avaient déjà observé Policard, Péhu, Roche

et Boucaumont. Dans les deux dernières zones, on note une importante fixation de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++}, dont l'évolution dans le temps est caractérisée par *une période initiale, du début à 4-6 heures, où les quantités de phosphore fixé sont de beaucoup supérieures aux quantités de calcium disparaissant de la solution, et une seconde période où l'on observe l'inverse. Au cours de celle-ci, le rapport : P fixé/Ca fixé est très voisin de celui caractérisant le phosphate tricalcique dans l'os métaphysaire, tandis qu'il lui demeure supérieur dans le cartilage d'accroissement.*

TABLEAU XXXVI. — *Valeurs moyennes des quantités de Ca et de P fixé et de P libéré par l'hydrolyse phosphatasique de l'ester, en présence de β-glycérophosphate, en fonction du temps d'expérience.*

(Embryons de 30 à 40 cm.).

Temps de macération (heures)	P libéré			P fixé			Ca fixé			P fixé / Ca fixé		
	Cartilage		Os métaphysaire	Cartilage		Os métaphysaire	Cartilage		Os métaphysaire	Cartilage		Os métaphysaire
	hyalin	d'accroissement		hyalin	d'accroissement		hyalin	d'accroissement		hyalin	d'accroissement	
2	0	11,10	10,40	0	8,50	5,50	0	0	0	—	—	—
4	0	14,23	20,90	0	10,66	9,75	2,60	4,33	6,66	—	2,46	1,46
6	2,73	19,35	19,55	1,08	10,72	11,11	2,08	17,17	22,20	0,52	0,62	0,50
8	1,50	29,93	25,73	1,50	15,96	16,23	11,00	20,00	34,50	0,09	0,80	0,47
10	7,15	35,20	28,25	7,15	20,95	18,85	—	29,00	36,00	—	0,72	0,52
12	11,60	43,50	41,03	4,86	25,16	20,00	15,93	39,50	39,35	0,30	0,63	0,51
14	9,95	41,70	47,45	6,25	27,00	24,45	10,66	40,00	46,00	0,58	0,67	0,53
16	7,75	48,25	40,35	1,75	33,20	24,50	15,00	42,00	42,75	0,11	0,58	0,47

Afin de nous rendre compte des relations pouvant exister entre l'intensité de l'hydrolyse des esters et celle de la fixation de $PO^{\equiv}_4$, nous avons rassemblé dans le tableau XXXVI le taux des ions phosphoriques libérés par l'hydrolyse des esters et celui des ions phosphoriques fixés. Si l'on calcule à partir de ces données les valeurs du rapport : phosphore libéré par hydrolyse de l'ester/phosphore fixé, on note qu'en fin d'expérience la proportionnalité entre le phosphore hydrolysé et le phosphore fixé, n'est pas identique à celle du début. Ici encore la fixation du phosphore est proportionnellement plus faible lorsqu'il y a plus d'esters hydrolysés et l'affinité pour $PO^{\equiv}_4$ dans la période initiale apparaît comme exceptionnelle, surtout dans l'os métaphysaire.

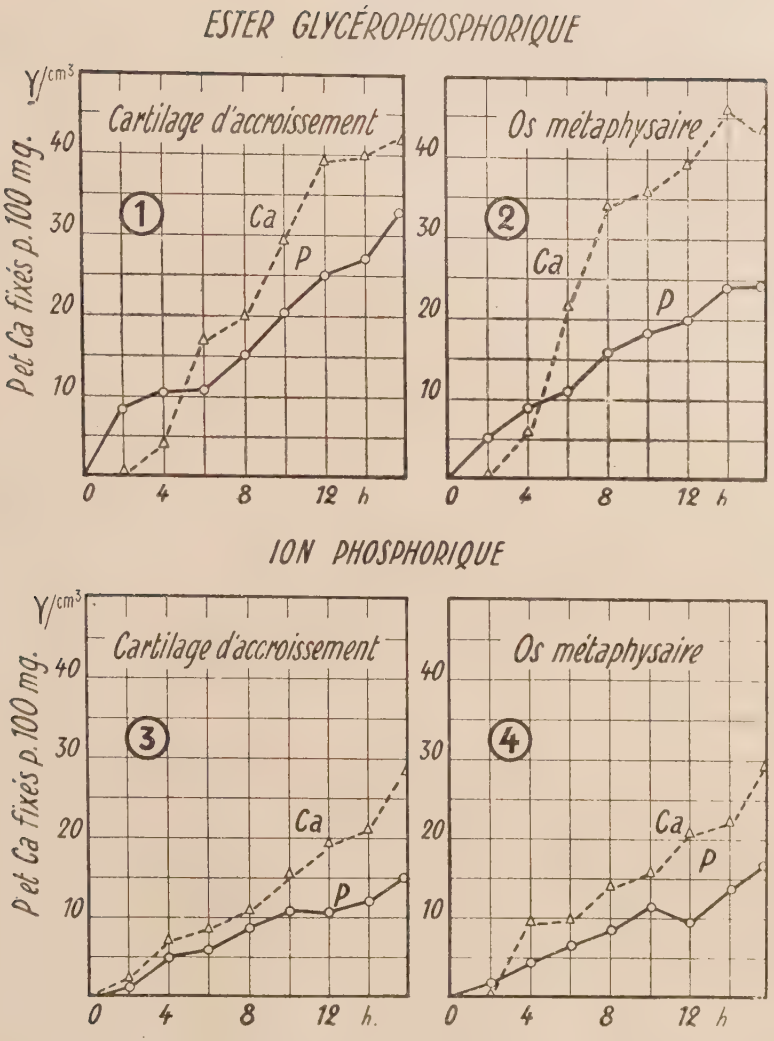

FIGURE 2. — *Fixation des ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} in vitro par le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire d'embryon de Mouton à partir de milieux renfermant soit ces ions, soit du β-glycérophosphate de sodium et Ca^{++}* (température : 37°, pH = 7,2).

Abscisses : temps en heures.
Ordonnées : γ P et Ca fixés par 100 mg.

La comparaison des résultats obtenus en présence de PO_4 à l'état d'ions $PO^{\equiv}_4$ ou estérifié, démontre que le cartilage de conjugaison ou l'os métaphysaire s'enrichissent beaucoup plus en phosphore et en calcium dans un milieu renfermant l'ester,

que dans celui où le phosphore est présent en quantité identique à l'état de phosphate minéral (figure 2). Il est donc certain que *la mise en liberté d'ions* $PO^{\equiv}_4$ *par les ostéoblastes permet une calcification beaucoup plus intense que la diffusion de ces ions à partir d'un liquide nutritif, et c'est là la démonstration du rôle physiologique de la phosphatase des os.*

4. **Expériences sur la fixation de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} en présence de phosphates ou de glycérophosphates, de Ca^{++} et de divers produits susceptibles de la modifier.** — Cette série d'expériences avait pour but de préciser la participation à la fixation des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} par la substance osseuse de processus indépendants de ravitaillement de celle-ci en ions. Pour chacun des corps étudiés nous avons opéré parallèlement en présence d'ions $PO^{\equiv}_4$ ou de glycérophosphate sur les os d'un même embryon. Chaque série comportait un témoin et des essais en présence des corps étudiés à des concentrations plus ou moins élevées. L'activité phosphatasique était, par ailleurs, connue grâce au dosage du phosphore de l'ester libéré par l'hydrolyse enzymatique.

Le fluorure de sodium inhibe nettement la fixation de $PO^{\equiv}_4$, beaucoup plus que celle de Ca^{++}, surtout lorsque les premiers sont directement apportés par le milieu. Il est possible que les résultats moins nets observés dans les solutions de glycérophosphate soient dûs au fait de la surcharge locale en $PO^{\equiv}_4$, résultat de l'action enzymatique qui n'est pas elle-même gênée.

L'acide monoiodacétique gêne également la calcification « in vitro », tant à patir de sels qu'à partir d'esters phosphoriques. Mais ici encore, cette action est plus faible lorsque l'enrichissement en $PO^{\equiv}_4$ est assuré par la phosphatase. Il semble bien, de nouveau, que cette inhibition porte plutôt sur la fixation de $PO^{\equiv}_4$ que sur celle de Ca^{++}.

L'acide monoiodacétique oxydant les groupements thiols, nous avons recherché quelle était l'action de ceux-ci, apportés par la cystéine. Il apparaît que ce corps n'exerce pas d'influence nette sur la fixation de $PO^{\equiv}_4$, apporté à l'état d'ester, mais la phosphatase est alors inhibée par la cystéine, ce qui trouble les expériences. En revanche, en *milieu minéral, la cystéine paraît favoriser la fixation de* Ca^{++}.

Quant à l'acide thioglycolique, il favorise la fixation de $PO^{\equiv}_4$ *à partir de sels ou d'esters, et celle de* Ca^{++}. Le cas de ce dernier corps est beaucoup plus significatif que celui de la

cystéine, car son pouvoir inhibiteur *in vitro* de la phosphatase est, aux taux employés, très minime et ne peut plus interférer dans les expériences. En définitive, toute chose étant égale du côté du ravitaillement en $PO^{\equiv}_4$, *les thiols favorisent la calcification* in vitro.

Enfin, l'acide ascorbique gêne assez nettement la calcification *in vitro*, quelle que soit la source de $PO^{\equiv}_4$.

Tel est l'ensemble des faits que nous avons observés, il y a maintenant lieu de discuter leur signification pour les interpréter.

B. — Discussion des résultats.

Un certain nombre de problèmes posés par les diverses phases du mécanisme de l'ossification peuvent être discutés à partir de nos résultats expérimentaux. Ce sont : la nature du sel phosphocalcique primitivement formé au cours de la calcification des os, le rôle de la phosphatase dans celle-ci, et, enfin, l'intervention de facteurs modifiant l'affinité de la matrice protéique pour les sels dans les processus d'ossification.

Il convient néanmoins, avant de les examiner, de faire remarquer que, si les résultats d'études sur la calcification *in vitro* peuvent, en première approximation, permettre une représentation du même phénomène *in vivo*, il ne faut pas oublier que l'on n'est pas en droit de pousser trop loin cette analogie pour plusieurs raisons. D'abord, les équilibres réalisés *in vitro* sont statiques, alors qu'ils sont dynamiques *in vivo*. La diffusion des ions dans le tissu isolé, en asphyxie progressive, est troublée ; enfin, les phénomènes cellulaires y sont altérés, tandis que les phénomènes d'ordre physico-chimique pur, tels que la précipitation du phosphate tricalcique, y demeurent « normaux ». Ces réserves étant faites, quel parti peut-on tirer de nos observations pour discuter le problème de la calcification des os ?

1. **Premières étapes de l'ossification et composition du « sel de l'os » au moment de sa formation.** — Comme nous l'avons discuté, la genèse du sel de l'os est encore mal connue. Diverses observations concourrent à montrer que, si l'os calcifié renferme du phosphate tricalcique, ce sel ne prend pas naissance par un processus aussi simple que celui envisagé par le schéma de Robison.

D'une part, Pfaundler, puis Freudenberg et György ont

montré que le cartilage articulaire fixe sélectivement le calcium dans des milieux renfermant des sels solubles de celui-ci, tandis que ce cartilage ne se combine à des ions phosphoriques que s'il est au préalable enrichi en calcium. Mais l'extrapolation de ces travaux au cartilage d'ossification, qu'il est surprenant de voir acceptée sans réserve par certains auteurs, ne saurait être faite. En effet, le cartilage hyalin ne s'ossifie pas, et nos recherches montrent que, placé dans un milieu renfermant des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}, il ne se comporte ni comme le cartilage d'accroissement, ni comme l'os métaphysaire. Il n'y a donc pas lieu de retenir les résultats de Pfaundler, de Freudenberg et György, comme reproduisant les processus de la calcification osseuse.

D'autre part, l'analyse d'os embryonnaires et celles d'os en voie de formation a donné des résultats qui ne sont pas favorables à l'hypothèse de la fixation directe de $(PO_4)_2\ Ca_3$ dès le début de la « prise » des pièces squelettiques. Roche et Mourgue, poursuivant une étude d'ensemble sur les os et les dents embryonaires (Mouton, Chèvre, Requin, etc.), ont observé qu'avant leur calcification, ces organes accumulent du phosphore et du calcium en quantités importantes. Leur teneur en cendres peut atteindre 20 p. 100 avant l'apparition de nodules osseux. Le rapport : Ca/P est alors toujours inférieur à celui qui correspond au phosphate tricalcique et parfois même, dans les organes très jeunes, à celui traduisant la présence de phosphate bicalcique.

Ultérieurement, ces mêmes auteurs ont démontré que la quasi-totalité du phosphate contenu dans ces organes est présent à l'état de radicaux très facilement ionisables, et non d'esters. Par ailleurs, le « sel de l'os » que l'on a isolé des pièces embryonnaires par la méthode de Morgulis, présente un rapport : Ca/P tel qu'il apparaît comme constitué par un mélange de $(PO_4)_2Ca_3$ et de PO_4CaH. C'est à la même conclusion que parviennent Ettori, Benoit, Grangaud et Clavert, à la suite d'analyses de sels osseux préparés selon Morgulis à partir d'os en voie de formation dans les cavités médullaires des os longs de pigeons soumis à des injections répétées de folliculine.

A la suite de cet ensemble de recherches, on peut se représenter le premier stade de l'ossification comme comportant : 1° la fixation individuelle des ions Ca^{++} et $PO^{\equiv}_4$; 2° la formation ultérieure de sel de l'os, dont la première étape serait la

précipitation de phosphate bicalcique, et la seconde celle de phosphate tricalcique. Les facteurs qui permettent la combinaison du calcium et du phosphore sont encore obscurs, mais on sait qu'au cours de l'évolution que subissent les protéines des territoires en voie d'ossification, leurs caractères histologiques se modifient profondément, ce qui ne peut tenir qu'à des remaniements moléculaires importants. Ces remaniements semblent correspondre à la mise en liberté d'ions fixés antérieurement par les protéines, et l'on peut envisager que ces ions, apparaissant alors à un taux élevé dans un territoire osseux, s'unissent pour donner naissance à PO_4CaH, lequel se transforme ultérieurement en $(PO_4)_2\ Ca_3$.

Les observations que nous avons faites sont-elles en accord avec ces faits et ces conceptions ?

Nous ne saurions les discuter sans remarquer à nouveau qu'il y a lieu de faire des réserves sur l'extrapolation des résultats obtenus sur un fragment d'os placé dans une solution « nutritive » à un territoire en voie d'ossification « *in vivo* ». Les faits réunis dans les tableaux XXXIV à XXXVI, indiquent qu'il existe un certain parallélisme entre les quantités de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} fixées par le fragment osseux ; mais l'hétérogénéité des fragments et la présence possible de cartilage hyalin (non ossifiable), peut être invoquée pour expliquer dans certains d'entre eux la fixation d'un excès de calcium pendant un temps global de 16 heures. Par ailleurs, la moyenne générale des valeurs du rapport : P/Ca dans les métaphyses est de 0,64, soit intermédiaire à celles caractérisant PO_4CaH (0,77) et $(PO_4)_2Ca_3$ (0,51). Tout se passe donc comme si, dans ces conditions, on assistait à la précipitation directe de PO_4CaH et de $(PO_4)_2Ca_3$ *in vitro*. Il n'est pas possible de préciser si le sel primitivement formé est un mélange, ou si PO_4CaH se transforme *in situ* en $(PO_4)_2Ca_3$. Toutefois, le fait que ce rapport est très voisin de celui correspondant à la formation de PO_4CaH dans le cas des embryons les plus petits (18 cm.) et plus bas dans le cas des embryons les plus développés, vient à l'appui de cette manière de voir.

L'étude de l'évolution de la fixation de Ca^{++} et de $PO_4^{\equiv}$ en fonction du temps, résumée dans le tableau XXXV et la figure 2, a donné à cet égard des résultats plus précis. En effet, il semble que, *dans le cartilage de conjugaison (zone d'accroissement) en particulier, le rapport : P/Ca diminue au fur et à mesure que la calcification aux dépens d'ions* $PO^{\equiv}_4$ *et* Ca^{++} *pro-*

gresse, et que lorsqu'une quantité assez importante de « sel de l'os » s'est déposée, il se trouve toujours à l'état de $(PO_4)_2\ Ca_3$.

Dans ces deux premières séries d'expériences, l'humeur baignant les fragments osseux renferme $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} dans des proportions correspondant à un rapport : P/Ca voisin de celui caractérisant $(PO_4)_2\ Ca_3$; il n'est donc pas surprenant que l'on assiste probablement à la précipitation de ce sel, le second mécanisme de Robison étant par ailleurs inaltéré.

Qu'observe-t-on en présence de glycérophosphate comme source de $PO^{\equiv}_4$, lorsque la phosphatase va jouer son rôle physiologique ? L'examen de la figure 2 et du tableau XXXVI, est à cet égard significatif. *Au cours des six premières heures d'expériences l'on assiste à la fixation d'un excès de radicaux phosphoriques*, libérés en abondance par action de la phosphatase au niveau des zones s'ossifiant. *Puis, rapidement, du phosphore tricalcique apparaît, le rapport : P/Ca étant alors sensiblement voisin de 0,51, caractéristique de* $(PO_4)_2\ Ca_3$, *dans les essais faits avec l'os métaphysaire. Ce rapport reste supérieur dans le cartilage d'accroissement*, soit à cause de la présence de zones hyalines ossifiables, dont nous avons signalé après Pfaundler l'exceptionnelle affinité pour Ca^{++}, soit encore parce que les premières étapes de l'ossification évoluent seules dans cette zone, tandis que c'est une ossification « complète » qui a lieu dans la zone métaphysaire. A cet égard, la comparaison des courbes 1 et 2 de la figure 2 est significative : à égalité de fixation de calcium, le cartilage d'accroissement s'enrichit relativement plus en phosphore que l'os métaphysaire et, par ailleurs, celui-ci fixe, à poids égal, plus de calcium.

Il semble bien que, dans les expériences faites sur milieu glycérophosphaté, les ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} soient fixés en quantité beaucoup plus grande que dans le cas de l'immersion des fragments osseux dans un milieu minéral, mais ce fait correspond-t-il au jeu normal du mécanisme de l'ossification ? Il peut être attribué à des différences dans la vitesse de diffusion des ions Ca^{++} dans l'un et l'autre cas. Lorsqu'un fragment osseux est immergé dans une solution minérale, $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} vont diffuser dans ses humeurs avec régularité, tandis que lorsque $PO^{\equiv}_4$ est produit dans les humeurs, celles-ci en renferment forcément en excès dès le début de l'expérience ; il pourra donc être retenu en dehors de toute précipitation. Par la suite, de nouveaux facteurs peuvent intervenir.

Les essais témoins montrent que c'est seulement après six

heures que l'on assiste à une certaine dissolution du « sel de l'os » des fragments étudiés. On doit dès lors envisager qu'à partir de ce moment, les ions $PO^{\equiv}_4$ formés en abondance *in situ*, forment avec les ions calcium apportés par la liqueur nutritive, ou provenant de la dissolution des sels osseux, un précipité de phosphates de calcium. Au niveau de la métaphyse, celui-ci est sans conteste $(PO_4)_2\ Ca_3$ à la fin des expériences.

En définitive, dans les conditions d'observation les plus précises que nous ayons réalisées, nous assistons à la formation de $(PO_4)_2\ Ca_3$ au cours de l'ossification *in vitro*. Mais il demeure possible que, même dans ce cas particulier, assez éloigné des conditions physiologiques normales, des étapes dans la formation du phosphate tricalcique doivent être envisagées pour expliquer la fixation préférentielle de $PO^{\equiv}_4$ au début des expériences. Le mécanisme normal de l'ossification peut ensuite être rapidement « débordé » par la formation de $(PO_4)_2\ Ca_3$, facilitée par l'ionisation du calcium osseux, bien mise en évidence par l'étude des témoins dans nos expériences.

2. **Rôle de la phosphatase dans l'ossification *in vitro*.** — Ce rôle se manifeste dans les expériences résumées dans le tableau XXXV et dans la figure 2. Il présente les caractères suivants.

A égalité de teneur en phosphore total et en calcium dans le milieu nutritif, les fragments osseux mis en présence d'esters phosphoriques se calcifient avec une beaucoup plus grande intensité que ceux mis en présence d'ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}. Ce fait est en accord avec l'observation de Robison et Soames, selon laquelle l'addition d'une quantité minime d'esters permet la calcification dans un milieu où la valeur du produit : Ca/P, est inférieure à celle où se produit la calcification à partir d'ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}. De plus, comme nous l'avons remarqué déjà, *une fixation préférentielle de $PO^{\equiv}_4$ se manifeste nettement au début de l'expérience.*

Dès lors, la phosphatase apparaît comme accélérant notablement la calcification des os *in vitro* selon un mécanisme qui ne peut être rattaché qu'à l'augmentation de la concentration des ions $PO^{\equiv}_4$ dans les régions osseuses où du phosphate tricalcique va se déposer. C'est là la réalisation d'un véritable « modèle » d'ossification qui illustre schématiquement le rôle de l'enzyme en accord avec la théorie de Robison : le produit de solubilité ne pouvant être dépassé $[PO^{\equiv}_4]_2 . [Ca^{++}]_3 = S$, $(PO_4)_2\ Ca_3$ précipite dès que le milieu s'enrichit en $PO^{\equiv}_4$.

Mais cette théorie, qui reflète à coup sûr le processus de calcification *in vitro*, traduit-elle les phénomènes physiologiques d'apparence similaire ? De nombreux faits permettent d'en douter, comme nous l'avons déjà fait remarquer et, dans nos expériences même, le fait que, dans les premières heures, la fixation des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} n'affecte pas la même évolution qu'ultérieurement est à cet égard significatif. Tout se passe comme si, *dans les premières périodes, le « sel de l'os » n'étant dissocié en ions qu'à un degré minime et l'enzyme libérant déjà des quantités importantes d'ions* $PO^{\equiv}_4$, *ceux-ci étaient fixés sans récolte parallèle d'ions* Ca^{++}, cette fixation « individuelle » étant admise par Pfaundler, par Roche et Mourgue, par Freudenberg et György. Par la suite, la mise en liberté en abondance d'ions Ca^{++} aux dépens du sel de l'os et leur apport par le liquide nutritif, permettent la formation immédiate d'un phosphate de calcium insoluble, probablement $(PO_4)_2\ Ca_3$.

Le fait que le rapport : $PO^{\equiv}_4$ libéré par hydrolyse de l'ester/ $PO^{\equiv}_4$ fixé, est plus élevé au début de l'expérience, vient à l'appui de cette hypothèse. Tout se passe comme si deux phénomènes différents évoluaient dans la première et dans la deuxième partie de l'essai.

Comment concilier ces faits avec ceux antérieurement acquis sur la phosphatase au point de vue de son action physiologique ? Comme une série de recherches de Roche et de ses élèves, Mourgue, Collet, Martin-Poggi, l'ont établi, l'on voit en général apparaître la phosphatase au cours du développement des os avant que ceux-ci ne se calcifient de manière importante, et par ailleurs, ces premiers stades de l'ossification, vont de pair avec la présence dans les pièces (os et dents) de phosphore et de calcium en proportion telle que le rapport : P/Ca, traduit un excès important de phosphore.

Il est donc clair que *le rôle physiologique de la phosphatase est d'enrichir localement les territoires en voie d'ossification en ions* $PO^{\equiv}_4$, *lesquels sont bloqués sous une autre forme que* $(PO_4)_2\ Ca_3$ *avant de donner naissance à celui-ci*, et nous avons vu que leur combinaison aux protéines osseuses a été envisagée. La matrice protéique n'acquiert qu'ultérieurement la propriété de fixer $(PO_4)_2\ Ca_3$, et cela indépendamment de son activité phosphatasique.

Somme toute, la phosphatase participe à une étape de l'ossification antérieure à la « prise » de l'os. Mais, comme dans un territoire en voie d'ossification des zones où le processus est

plus ou moins avancé sont intriquées, on saisit en général la résultante de divers phénomènes évoluant chacun dans une zone particulière, ce qui rend leur analyse difficile. Dans un fragment d'os *in vitro*, l'activité phosphatasique d'une zone non ossifiable libère $PO^{\equiv}_4$ au voisinage immédiat d'une autre apte à se calcifier et la dissociation du « sel de l'os » libère par ailleurs Ca^{++}. De ce fait, la calcification du fragment osseux sera directement favorisée par l'action enzymatique.

En définitive, la phosphatase libérant en abondance des ions $PO^{\equiv}_4$, permet la formation du phosphate tricalcique dans l'os *in vitro*, mais par un mécanisme qui n'est pas obligatoirement superposable à celui existant *in vivo*. En effet, dans le premier cas, l'augmentation locale de $PO^{\equiv}_4$ s'opère à une concentration fixe de calcium, celle du calcium ionisable des humeurs, tandis que dans le second, $PO^{\equiv}_4$ augmente en même temps que le sel de l'os se dissout, jusqu'à ce que l'on ait atteint un état d'équilibre, à partir duquel se fait la précipitation de $(PO_4)_2\ Ca_3$.

3. **L'affinité de la matrice protéique pour les ions salins et les facteurs qui la modifient.** — Un des faits particulièrement bien mis en évidence par Robison, Rosenheim et leurs collaborateurs, est que la *calcification de la matrice protéique de la substance osseuse est un phénomène entièrement distinct de l'activité phosphatasique*. Nous nous sommes efforcés de mesurer quantitativement l'affinité des diverses régions des os longs embryonnaires pour les ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}, afin d'étudier les modalités suivant lesquelles elle se manifeste et se modifie.

Nos expériences ont été poursuivies pendant la période où la formation de $(PO_4)_2\ Ca_3$ n'est pas très intense et où il paraît probable que les ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} sont fixés séparément sur le tissu osseux. Nous pouvions donc espérer voir se manifester avec une certaine sélectivité l'affinité de celui-ci pour chaque ion et la modifier spécifiquement. Par ailleurs, l'étude parallèle de la calcification *in vitro* en présence de phosphates et d'esters phosphoriques devait apporter des renseignements sur les relations éventuelles entre l'activité phosphatasique et la fixation des radicaux phosphoriques.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus en présence d'ions $PO^{\equiv}_4$ ou d'esters, sont exactement identiques. De sorte que l'affinité de l'os pour les ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} doit bien être considé-

rée comme une propriété en soi, ainsi que le pensent Robison et Roche. Cette propriété est celle qui distingue l'os de tous les autres tissus. Son existence est la condition même de l'ossification, en sorte que son étude est d'un grand intérêt.

Un premier fait mérite d'être relevé : *divers corps modifient l'aptitude de l'os à fixer $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} ; ils n'agissent pas identiquement sur l'enrichissement en $PO^{\equiv}_4$ et en Ca^{++}. En présence de fluorures, la fixation de $PO^{\equiv}_4$ est plus diminuée que celle de Ca^{++}. De même en présence d'acide monoiodacétique. En présence de cystéine et plus encore d'acide thioglycolique, la fixation de calcium est en général plus fortement favorisée que celle des phosphates,* l'inhibition de l'acide ascorbique affectant à peu près identiquement l'un et l'autre. C'est là un nouvel argument en faveur de la fixation sélective de chaque ion, discutée plus haut.

Le second fait est plus important. Il traduit les *modifications de la fixation des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} par la matrice protéique de l'os indépendamment de son activité phosphatasique ;* par lui nous rejoignons les conclusions de Robison en ce qui concerne le « second mécanisme » de cet auteur. S'il est cependant prématuré de systématiser de manière formelle nos observations, elles indiquent néanmoins avec netteté *l'intervention possible de systèmes d'oxydo-réduction dans la fixation du phosphore et du calcium par l'os.*

En effet, l'acide monoiodacétique, dont l'action oxydante vis-à-vis des thiols est bien connue, exerce une action inverse de celle des thiols, en particulier, de l'acide thioglycolique. De même, l'action inhibitrice faible de l'acide ascorbique mérite d'être retenue. Une étude systématique des divers corps oxydants ou réducteurs est nécessaire pour pouvoir formuler à cet égard une opinion ferme, mais il nous paraît dès maintenant qu'elle doit être féconde. De toute manière, les faits observés attirent à nouveau l'attention sur l'importance de la matrice protéique de l'os et de ses propriétés dans le processus de l'ossification. L'intérêt de ce facteur avait déjà été souligné par Roche et Simonot dans leurs recherches sur l'affinité des os pour $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} dans le rachitisme expérimental et il s'affirme de plus en plus grand.

C'est au niveau de la matrice protéique que se fixent les sels, ce qui n'est possible qu'en raison de particularités de structure de ses constituants. Le mécanisme de cette fixation est le problème fondamental de l'ossification, mais son étude

a été jusqu'ici négligée, faute de moyens matériels de l'entreprendre. Le premier but de notre travail était d'établir une méthode chimique d'étude de la fixation de ces ions, afin de pouvoir poursuivre dans ce domaine des recherches sur un plan quantitatif que les recherches histologiques et histochimiques ne permettent pas d'atteindre. L'expérience a montré que nous disposons maintenant d'une méthode délicate à mettre en exécution et d'une précision limitée, mais suffisante pour entreprendre une première série de recherches dans la voie envisagée. On entrevoit déjà que les phénomènes enzymatiques dans le domaine d'oxydo-réductions complexes participent activement à la calcification, ainsi que des processus de protéolyse libérant des groupements -SH. C'est là un point de vue nouveau vers lequel il convient de s'orienter.

Nous espérons que la continuation des recherches auxquelles nous nous sommes attachés permettra d'examiner la validité de ces hypothèses, à l'édification desquelles notre travail apporte une première contribution. Il est impossible actuellement de prévoir quelle en est la valeur, mais, dès à présent, nos recherches et celles de divers biochimistes font apparaître la calcification comme un phénomène biologique complexe, auquel participent la phosphatase et la matrice protéique de la substance osseuse, et non, comme une représentation trop simple des faits l'avait tout d'abord laissé supposer, une simple précipitation de phosphate tricalcique à partir d'ions apportés par les humeurs.

VI. *RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.*

Nous avons étudié la calcification *in vitro* d'os embryonnaires immergés dans des milieux renfermant soit des ions calcium et phosphoriques, soit des ions calcium et du β-glycérophosphate de sodium, dans un rapport tel que le produit $Ca \times P = 50$ environ, à pH = 7,2 et à 37°, dans des conditions aussi soigneusement standardisées que possible. Nos expériences ont porté sur des fragments de cartilage hyalin, de cartilage de conjugaison (zone d'accroissement) et d'os métaphysaire. Elles ont comporté la détermination des quantités de Ca et de P fixées, soit durant une période globale de 6 heures et de 16 heures soit aux divers temps d'une période de 16 heures. Leurs principaux résultats sont les suivants :

I. Le cartilage hyalin fixe en abondance des ions Ca^{++} et ne se combine qu'à des quantités minimes d'ions $PO^{\equiv}_4$, tandis que le cartilage de conjugaison fixe Ca^{++} et $PO^{\equiv}_4$ en quantités importantes. On ne peut donc pas, comme l'ont fait Pfaundler, Freudenberg et György pour élaborer la théorie dite « des fixateurs des sels de calcium », tirer d'observations faites sur la combinaison des ions calcium au cartilage articulaire, des conclusions s'appliquant à la calcification du cartilage d'accroissement, et, *a fortiori,* du tissu osseux.

II. Dans des milieux renfermant des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}, la fixation de ceux-ci par le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire n'évolue pas de manière rigoureusement parallèle aux divers temps de l'expérience, ce qui peut être dû à la dissolution progressive du « sel de l'os » simultanée au phénomène étudié. Le rapport : Phosphore fixé/Calcium fixé, est en général supérieur à celui correspondant à $(PO_4)_2\ Ca_3$, mais inférieur à celui de PO_4CaH. Au fur et à mesure que l'expérience se poursuit, les quantités de calcium et de phosphore fixées se rapprochent de celles traduisant la formation de $(PO_4)_2\ Ca_3$.

Il est possible qu'il existe à cet égard des différences selon le degré de développement des embryons ; parmi ceux que nous avons étudiés, les plus jeunes fixent $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} dans un rapport correspondant plus à la formation de $PO_4\ CaH$ qu'à

celle de $(PO_4)_2\ Ca_3$, tandis que l'on observe le contraire lorsque les embryons sont près du terme.

III. En présence de glycérophosphate de sodium et d'ions calcium, la calcification évolue beaucoup plus rapidement qu'en présence d'ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} aux mêmes concentrations en P et Ca total ; le rapport : P fixé/Ca fixé, correspond à la formation de $(PO_4)_2\ Ca_3$ à partir de la sixième heure d'expérience et traduit auparavant la fixation d'un important excès de phosphore.

L'action de la phosphatase provoque donc une accélération importante de la calcification *in vitro* grâce à la libération *in situ* d'un excès d'ions $PO^{\equiv}_4$ apparaissant probablement à concentration très élevée au voisinage des ostéoblastes sécrétant l'enzyme.

Les différences dans la fixation de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} aux divers temps de l'expérience suggère l'hypothèse que seuls les phénomènes observés au cours des premières heures et traduisant une fixation sélective des ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} sont physiologiques, la formation ultérieure de $(PO_4)_2\ Ca_3$ étant liée à un équilibre de dissolution du « sel de l'os ».

IV. La combinaison de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++} à la matrice protéique de l'os *in vitro*, se modifie en présence de fluorure de sodium, d'acide monoiodacétique, de cystéine, d'acide thioglycolique et d'acide ascorbique à des concentrations où ces corps n'exercent sur la phosphatase qu'une action minime ou nulle. Ces corps, qui agissent sur « le second mécanisme » de Robison, modifient l'affinité de l'os pour les ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++}, mais ils agissent sélectivement et inégalement sur la fixation de $PO^{\equiv}_4$ et de Ca^{++}.

V. Les thiols, surtout l'acide thioglycolique, favorisent la calcification alors que l'acide monoiodacétique l'inhibe. L'acide ascorbique la gêne faiblement. On peut, de ce fait, penser que des processus d'oxydoréduction interviennent directement ou indirectement dans la régulation de l'affinité de la matrice protéique pour les ions à partir desquels se constitue le « sel de l'os ».

VI. La calcification osseuse apparaît comme un processus physiologique complexe, dont le mécanisme physico-chimique de la formation du « sel de l'os » n'est qu'un élément, auquel s'ajoutent le ravitaillement phosphatasique de l'os en ions

phosphoriques et l'affinité de la matrice protéique pour les ions $PO^{\equiv}_4$ et Ca^{++} et leurs combinaisons, affinité probablement liée à des processus oxydoréducteurs.

VII. La calcification *in vitro* des os, ne saurait être exactement assimilée à l'ossification, car elle met en jeu non seulement le mécanisme normal de celle-ci, mais aussi la dissociation du « sel de l'os ». Elle constitue une sorte de « modèle d'ossification », à certains égards artificiel.

Marseille, le 17 Avril 1943.

Vu : *le Président,*
JEAN ROCHE.

Marseille, le 19 Avril 1943.

Vu et approuvé :
Le Doyen,
LUCIEN CORNIL.

Vu et permis d'imprimer

Aix, le 24 Avril 1943.

Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Albers (H.). — Phosphatasen, in *Handbuch der Enzymologie*. Akad. Verlag, Leipzig, 1940, **1**, 408-479.
2. Bamann (E.), Riedel (E.) und Diederichs (K.). — Zur Freilegung der Phosphoesterasen aus der Leber. (2 Abhandlung : Zur Kenntnis der Phosphatasen). *Z. physiol. Chem.*, 1934, **230**, 175.
3. Bamann (E.) und Salzer (W.). — Ueber die Mg- Aktivierung bei Phosphatasen. *Ber. d. dtsch. chem. Ges.*, 1937, **70**, 1263.
4. Barrenscheen (H. K.) und Lang (S.). — Zur Kenntnis der Adenosintriphosphatase der Leber. *Biochem. Z.*, 1932, **252**, 395.
5. Bauer (E.). — Beitrag zum Aktivierungsmechanismus der Phosphatasen. Pyrophosphatasen II. *Z. physiol. Chem.*, 1937, **248**, 213.
6. Belfanti (S.), Contardi (A.) and Ercoli (A.). — Studies on the Phosphatases. The influence of some electrolytes on the phosphatases of animal tissues. Phosphatases of the liver, kidney, serum and bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 842.
7. Belfanti (S.), Contardi (A.) and Ercoli (A.). — Researches on the phosphatases. II. Inactivation and reactivation of the phosphatase of animal organs. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 842.
8. Belfanti (S.), Contardi (A.) and Ercoli (A.). — Researches on the phosphatases. III. On the mechanism of inactivating action of sodium oxalate and of phosphates on the « alkaline » phosphatases of animal tissues. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1491.
9. Benjamin (H. R.). — The nature and significance of the filtrable adsorbable calcium phosphorus complex. *J. of biol. Chem.*, 1933, **100**, 54.
10. Benjamin (H. R.). — The forms of the calcium and inorganic phosphorus in animal sera. II. The nature and significance of the filtrable adsorbable calcium-phosphorus complex. *J. of Biol. chem.*, 1931, **100**, 57.
11. Benoit (J.), Clavert (J.) et Grangaud (R.). — Action de la folliculine sur le métabolisme du calcium chez les Oiseaux. I. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1341.
12. Blum (L.), Delaville et Van Caulaert. — Contribution à l'étude de la pathogénie du rachitisme. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 184.
13. Bodansky (O.) and Bakwin (H.). — Effect of parathormone on bone phosphatase activity *in vitro*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1933, **31**, 64.
14. Bodansky (O.), Bakwin (R. M.) and Bakwin (H.). — The distribution of phosphatases in the tissues of teleosts and elasmobranchs. *J. of Biol. Chem.*, 1931, **94**, 551.

15. Bodnar et Karell. — Cités d'après Folley et Kay [**32**].
16. Bogert (J.) and Baird-Hastings. — The calcium salts of bones. *J. of Biol. Chem.*, 1931-1932, **94**, 473.
17. Brooke (R.), Smith (A.) and Smith (P.). — Inorganic salts in nutrition. *J. of Biol. Chem.*, 1934, **104**, 141.
18. Brull, Larsson et Tufts. — Cités par Policard (A.) et Roche (J.) [**82**].
19. Brull. — *Bruxelles médical*, 1937, **44**, 1557.
20. Cattaneo (C.), Gabrielli (M. C.) e Scoz (G.). — Fosfatasi alcalina e attivazione in presenza dei sali di magnesio. *Enzymolog.*, 1937, **2**, 17.
21. Cedrangolo (F.) e Del Regno (F.). — Stato della fosfatasi alcalina negli organi e nei prepari enzimatici e una attivazione ad opera dei Mg^{++}. *Arch. di Scz. Biol.*, 1937, **23**, 504.
22. Chievitz (O.) et Hevesy (G.). — *Nature*, 1935, **136**, 754, cité d'après Hevesy [**43**].
23. Cloetens (R.). — Préparation et propriétés de la phosphatase alcaline. I. *Enzymolog.*, 1939, **7**, 157 et 333.
24. Common (R. H.). — Serum phosphatases in the domestic fowl. *Nature*, 1934, **133**, 572.
25. Cretin (A.). — Recherches sur l'ossification et sur la réparation des os fracturés. Le Mans, 1925, 1 vol., 351 p.
26. Dallemagne (M. J.) et Brasseur (H.). — La diffraction des rayons X par la substance minérale osseuse. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 1942, **8-9**, 1-19.
27. Erdtman (H.). — Glycerophosphatspaltung durch Nierenphosphatase und ihre Aktivierung. *Z. f. Physiol. Chem.*, 1927, **172**, 182.
28. Ettori (J.), Grangaud (R.), Benoit (J.) et Clavert (J.). — Action de la folliculine sur le métabolisme du calcium chez les Oiseaux. II. Ossification folliculinique et phénomènes de la calcification primaire. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1323.
29. Fell (H. B.) and Robison (R.). — The development of the calcifying mechanism in avian cartilage and osteoid tissue. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2243.
30. Fell (H. B.) and Robison (R.). — The development and phosphatase activity *in vitro* of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1905.
31. Fell (H. B.) and Robison (R.). — The growth, development, and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated *in vitro*. *Biochem. J.*, 1929, **23**, 767.
32. Folley (S. J.) and Kay (H. D.). — The phosphatases. *Erg. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 159.
33. Freudenberg (E.) et György (P.), cités par Schoen (J.). — Les fixateurs du calcium chez l'enfant. *Thèse Méd.*, Lyon, 1927. Bosc et Riou éd., 187 p.
34. Freudenberg (E.) und György (P.). — Ueber Kalkbindung durch tierische Gewebe. I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X. *Biochem. Z.*, 1920, **110**, 290 ; 1921, **115**, 96 ; 1921, **118**, 30 ; 1921, **121**, 130 et 142 ; 1221, **124**, 299 ; 1922, **129**, 134 et 138 ; 1923, **142**, 407 ; 1924, **147**, 191.
35. Gabriel. — *Z. Physiol. Chim.*, 1894, **18**, 257, cité d'après Robison (R.) [**88**].
36. Garcia (I.). — Recherches sur l'ossification. *Thèse Doct. Sc. nat.*, Montpellier, 1935, 1 vol. 241 p., G. Patissier éd., Trévoux.

37. Gassmann (T.). — Cité par Kay (H. D.). — The chemistry and metabolism of the compounds of animal phosphorus. *Ann. Review of Biochemistry*, vol. I, p. 190.
38. Gegenbaur, Studnicka, Retterer et Waldeyer. — Cités par Policard (A.) et Leriche (B.) dans : Physiologie normale et pathologique de l'os. 1 vol., Masson et Cie éd., Paris.
39. Goldblatt (H.). — A study of the relation of the quantity of fat soluble factor in the diet to the degree of calcification of the bones and the development of experimental rickets in rats. *Biochem. J.*, 1923, **17**.
40. Gusmitta (M.). — *Archiv. Ital. Biol.*, 1893, **19**, 220. Cité par Brooke, Smith et Smith, in : *J. of. Biol. Chem.*, 1934, **104**, 141.
41. Händel (M.). — *Pflügers Arch.*, 1927, **104**, 92. Cité d'après Klinke (K.) [**57** *bis*].
42. Harris (H. A.). — *Nature*, 1932, **130**, 996. Cité d'après Folley (S. J.) et Kay (H. D.) [**32**].
43. Hevesy (G.). — The application of isotopic indication in biological research. *Enzymolog.*, 1938, **5**, 138.
44. Holmberg (C. G.). — Ueber den Mechanismus bei der Mg- Aktivierung der Darmphosphatase. *Biochem. Z.*, 1935, **279** 145.
45. Holt (L.), La Mer (V.) and Chown (B.). — Studies on calcification. I. The solubility product of secondary and tertiary calcium phosphate under various conditions. *J. of Biol. Chem.*, 1927, **646**, 509.
46. Holt (L.), La Mer (V.) and Chown (B.). — Delayed equilibrium between the calcium phosphates and its significance. *J. of Biol. Chem.*, 1925, **64**, 569.
47. Hoppe-Seyler (F.). — Cité par Morgulis (S.), in : Studies on the composition of bone ash. *J. of Biol. Chem.*, 1931, **93**, 455.
47 *bis*. Hove (E.), Elvehjem (C. A.) and Hart (E. B.). — The effect of zinc on alkaline phosphatase. *J. of Biol. Chem.*, 1940, **134**, 425.
48. Howland (J.), Marriot and Kramer (B.). — Studies upon inorganic composition of bone. *J. of Biol. Chem.*, 1926, **68**, 761.
49. Howland (J.) and Kramer (B.). — Factors concerned in the calcification of bones. *Trans. Amer. ped. Soc.*, 1922, p. 134.
50. Inouye (K.). — Die pH - Abhängigkeit der Glycerophosphatase. *J. of Biochem.*, 1928, **10**, 133.
51. Irving (L.) et Chute (A. L.). — Cités par Brooke, Smith et Smith, in : *J. of Biol. Chem.*, 1934, **104**, 141.
52. Jenner (H. D.) and Kay (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. III. Magnesium and the phosphatase system. *J. of Biol. Chem.*, 1931, **93**, 733.
53. Jung (A.). — Le mécanisme de la résorption osseuse. *Rev. Chir.*, 1937, n° 7.
54. Kay (H. D.). — Phosphatase in growth and disease of bone. *Physiol. Rev.*, 1932, **12**, 384.
55. Kay (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. The quantitative distribution of phosphatases in certain mammalian tissues. *Biochem. J.*, 1928, **22**, 855.
56. King (E. J.) and Delory (G. E.). — Ascorbic acid and phosphatase activity. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1157.
57. Klement (R.), cité par Kay (H. D.). — The chemistry and metabolism of the compounds of animal phosphorus. *Ann. Rev. of Biochem.*, **1**, 190.
57 *bis*. Klinke (K.). — Der Mineralstoffwechsel, Physiologie und Pathoholgie. 1 vol., F. Deuticke éd., Leipzig, 1931, 151 p.

58. Laromiguière (S. de). — Le système phosphatasique de l'intestin. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1942, 1 vol., Declume éd., Lons-le-Saunier, 110 p.
59. Laurens (A.). — Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1942, 1 vol., Declume éd., Lons-le-Saunier, 118 p.
60. Lehnartz (E.). — Einführung in die chemische Physiologie. 1 vol., 420 p., J. Springer éd., Berlin, 1937.
61. Logan (M. A.) and Taylor (H. L.). — Solubility of bone salt. II. Factors affecting its formation. *J. of Biol. Chem.*, 1937, **119**, 293.
62. Logan (M. A.) and Taylor (H. L.). — Solubility of bone salt. III. Partial solution and carbonate containing calcium phosphate precipitates. *J. of Biol. Chem.*, 1938, **125**, 377.
63. Logan (M. A.) and Kane (L. K.). — Solubility of bone salt. IV. Solubility of bone in biological fluids. *J. of Biol Chem.*, 1939, **127**, 705.
64. Logan (M. A.), Shear (M. J.) and Kramer (B.). — Composition of bone. III. Physiochemical mechanism. *J. of Biol. Chem.*, 1928, **79**, 125.
65. Logan (M. A.). — Composition of cartilage, bone, dentin, and enamel. *J. of Biol. Chem.*, 1937, **110**, 375.
66. Lowater (F.) and Murray (M. M.). — Chemical composition of teeth. V. Spectrographic Analysis. *Biochem J.*, 1937, **31**, 837.
67. Mac Clure (F. J.) and Mitchell (H.). — The effect of fluorine on the calcium metabolism of albinos rats and the composition of the bones. *J. of Biol. Chem.*, 1931, **90**, 297.
68. Mac Farlane (M. G.), Patterson (L. B. M.) and Robison (R.). — The phosphatase activity of animal tissues. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 720.
69. Martland (M.) and Robison (R.). — Possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. VI. Phosphoric esters in blood plasma. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 847.
70. Martland (M.) and Robison (R.). — The preparation and use of the bone phosphatase. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 847.
71. Martland (M.) and Robison (R.). — The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 1927, **21**, 665.
72. Mellanby. — Cité par Lehnartz (E.) [**60**].
73. Morgulis (S.). — Studies on the chemical composition of bone ash. *J. of Biol. Chem.*, 1931, **93**, 455.
74. Morse (K.), Hasting (A.) and Roseberry (H.). — X-ray analysis of bone and teeth. *J. of Biol. Chem.*, 1931, **90**, 395.
75. Mouriquand (G.), Leulier (A.) et Roche (A.). — Magnésium et rachitisme expérimental. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 676.
76. Munemura (S.). — Ueber den Einfluss der Elektrolyten auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *J. of Biol. Chem.*, 1933, **17**, 343.
77. Nicolayssen (R.). — Studies upon the mode of action of vitamin D. — I. Investigations upon the phosporus compounds of muscle, liver, kidney, as influenced by different levels of vitamin and phosphorus in the diet. — II. The influence of vitamin D on the foecal output of endogenous calcium and phosphorus in the rat. — III. The influence of vitamin D on the absorption of calcium and phosphorus in the rat. — IV. The absorption of calcium chloride, xylose and sodium

sulphate from isolated loops of the small intestine and of calcium chloride from the abdominal cavity of the rat. — V. The absorption of phosphate from intestinal loops of the small intestine of rats. *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1329. — *Ibid.*, 1937, **31** 117, 122, 323, 1086.

78. Page (I. H.). — Wirkung der Nebenschilddrusenhormonen auf phosphatase. *Biochem. Z.*, 1930, **223**, 222.
79. Pfaundler. — Cité par Policard (A.) et Roche (J.) [**83**].
80. Pisa (M.). — Modificazione dell' attivita fosfatasica dell' osso doppo neurectomia. *Biochem. Terap. Sperim.*, 1934, **21**, 497.
81. Pisa (M.) e Capo (M.). — Die Wirkung kleiner Mengen von Nebenschilddrusenhormonen auf das Magnesiumghalt des Organismus. *Z. f. d. ges. exp. Mediz.*, 1935, **95**, 675.

81 *bis.* Policard (A). — L'appareil de croissance des os longs. Ses mécanismes à l'état normal et pathologique. 1 vol., 216 p., Masson et Cie éd., Paris, 1941.

82. Policard (A.) et Roche (J.). — La formation de la substance osseuse. Essais de coordination des données histologiques et biochimiques. *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, 1937, **4**, 13.
83. Policard (A.), Péhu (M.), Roche (J.) et Boucaumont. — Répartition histologique de la phosphatase dans la zone d'ossification des os longs chez l'enfant normal et rachitique. *Bull. Hist. Appl.*, 1931, **8**, 171.
84. Pyle (J. J.), Fisher (J. H.) and Clark (R. H.). — The effect of certain physiologically important materials upon kidney phosphatase *J. of Biol. Chem.*, 1937, **119**, 283.
85. Randoin (L.) et Lecoq (R.). — Constitution d'un nouveau régime artificiel pour l'étude du rachitisme expérimental. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 1277.
86. Robison (R.). — The significance of phosphoric esters in metabolism. The N.-Y. Univ. Press, 1933, 104 p.
87. Robison (R.). — Bone phosphatase. *Ergeb. d. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 280.
88. Robison (R.). — The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 1923, **17**, 286.

88 *bis.* Robison (R.), Macleod (M.) and Rosenheim (H. A.). — The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. IX. Calcification *in vitro*. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1927.

89. Robison (R.) and Rosenheim (H. A.). — Calcification of hypertrophic cartilage *in vitro*. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 684.

89 *bis.* Robison (R.) and Soames (K. M.). — The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. VIII. Calcification *in vitro*. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1922.

90. Roche (A.). — Etude du bilan phosphoré chez le Rat soumis à un régime riche en calcium, magnésium ou en strontium. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14**, 634.
91. Roche (A.), Roche (J.) et Marcelet (Y.). — Ossification des os plats, étapes du développement du squelette et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 705.
92. Roche (A.) et Garcia (I.). — Variations du rapport P/N de l'os au cours de la croissance chez le Rat. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1029.
93. Roche (A.) et Garcia (I.). — Recherches sur l'ossification. I. Ossification normale et constitution de réserves minérales

dans les os au cours du développement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 1014.
94. Roche (J.). — Sur les phosphatases du sang. — B. Spécificité des phosphatases du sang et de divers tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 841.
95. Roche (J.) et Marcelet (Y.). — Nature du régime et action de la vitamine D chez l'animal en croissance et chez l'adulte. *Comm. Congrès Médecine*, Marseille, XXV[e] session, 1938, 333.
96. Roche (J.) et Filippi (A.). — Activité phosphatasique des os et hormone parathyroïdienne. *C. R. Soc. Biol*, 1938, **129**, 326.
97. Roche (J.) et Bullinger (E.). — Sur le système phosphatasique des hématies. *Enzymol.*, 1939, **7**, 278.
98. Roche (J.) et Mourgue (M.). — Action comparée de l'hormone parathyroïdienne et de la vitamine D sur la consolidation des fractures osseuses expérimentales. *C. R. Soc. Biol.*, 1939.
99. Roche (J.) et Mourgue (M). — Recherches sur l'ossification. XII. Premières étapes de la calcification du squelette (os et dents) et rôle de la phosphatase dans l'ossification. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1186.
100. Roche (J.) et Martin-Poggi (R.). — Recherches sur l'ossification. IX. Rôle de la vitamine C et de la phosphatase dans la formation de la substance osseuse, en particulier dans les cals de fractures. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 1534.
101. Roche (J.) et Simonot (M. T.). — Activité phosphatasique des os et mécanisme de production du rachitisme expérimental. *Bull. Acad. Méd.*, 1941, **125**, 272-275.
102. Roche (J.) et Nguyen-van Thoai. — Sur l'activation et l'inhibition de diverses phosphatases par l'ion Mg^{++}. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1237.
103. Roche (J.). — La phosphatase des os, pp. 251-269, in *Exposés annuels de Biochimie médicale*, **3**, 1 vol., 296 p., Masson et Cie éd., Paris, 1942.
104. Rominger (S.). — Physiologie und Pathologie des D Vitamins. *Ergeb. d. Horm. u. Vit. Forsch.*, 1939, **2**, 104.
104 *bis*. Rosenheim (H. A.). — The effect of serum-proteins on calcification *in vitro*. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 699.
105. Shear (M. J.) and Kramer (B.). — Composition of bone. I. Analytical micromethod. *J. of Biol. Chem.*, 1928, **79**, 125.
106. Shear (M. J.) and Kramer (B.). — Composition of bone. Physicochemical mechanism. *J. of Biol. Chem.*, 1928, **68**, 761.
107. Shelling (D.), Kramer (B.) and Orent (R.). — Studies upon calcification *in vitro*. III. Inorganic factors determining calcification. *J. of Biol. Chem.*, 1928, **77** 569.
108. Shipley (P. G.), Kramer (B.) and Howland (J.). — Studies upon calcification *in vitro*. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 379.
109. Shipley (P. G.), Park (E.), Mac Collum (E.) and Simmonds (N.). — Studies in experimental rickets. III. A pathological condition bearing fondamental resemblance to rickets of the human being resulting from diets low in phosphorus and in fat soluble. — A. The phosphate ion in its prevention. *John Hopkins Hosp. Bull.*, 1921, **32**, 160.
110. Schmidt (W. J.). — Die Bausteine des Tierkörpers. 1924, F. Cohn éd., Bonn., 296 p.
110 *bis*. Simonot (M. T.). — Recherches sur le mécanisme du rachitisme expérimental. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1940, 1 vol., M. Declume éd., Lons-le-Saunier.
111. Takata (H.). — Einfluss der Gallensaüren auf Glycerophosphatase. *J. of Biochem.*, 1931, **14**, 61.

112. Taylor, De Jong and Sheard. — Cités par Kay (H. D.), in : *Ann. Rev. of Biochem.*, I, 190.
113. Taylor, De Jong and Sheard. — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1926, **45**, 445, cités par Morgulis (S.).
114. Tannhäuser (S. J.), Reichel (M.), Grattan (J. F.) and Maddock (S. J.). — Studies on serum phosphatase activity *J. of Biol. Chem.*, 1936, **121**, 687, 709, 715, 721, 727.
115. Uzawa (S.). — Ueber die Kleienphosphoesterase. I und II. Ueber die Phosphomonoesterase und die Phosphodiesterase. *J. of Biochem.*, 1932, **15**, 1, 11, 19.
116. Vebner (V.). — *Sitz. Akad. d. Wissensch. Math. Naturw.*, Wien, 1875, **70**, 105, cité d'après Klinke (K.) [**57** *bis*].
117. Wellman (O.), Marek (J.) and Urbanyi (L.). — Chemischer aufbau der Knochensaltze bei genunden und rachitischen Tieren. *Z. Phys. Chem.*, 1934, **226**, 3.
118. Werner. — Cité par Morgulis (S.) [**73**].
119. Westenbrink (H. G. K.). — Beitrag zur Kenntnis der Darmphosphatase. *Arch. Néerl. Physiol.*, 1935, **20**, 566.

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

PREMIÈRE PARTIE.

Introduction.

I. — *La composition de la substance osseuse en général*.. 12

A. Le support protéique 12

B. Le complexe minéral de l'os 12

II. — *Mécanisme de la formation de la substance osseuse*.. 17

A. Données déduites de l'observation biochimique des diverses étapes de la formation de l'os.... 17

1. Modification du support protéique.... 17

2. Apport des éléments minéraux, et intervention de la phosphatase 18

3. Fixation des ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++}..... 20

4. Labilité du sel de l'os, et évolution de l'os en général 23

B. Ossification *in vitro*, et phosphatase des os.... 27

1. La phosphatase des os 27

2. Calcification *in vitro*, et phosphatase.. 29

III. — *Objet du travail* 36

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles.

I. — *Techniques générales* 41

A. Matériel d'étude 41

B. Solution nutritive 43

C. Dosage du calcium et du phosphore 44

II. — *Fixation* in vitro *des ions* $PO_4^{\equiv}$ *et* Ca^{++} *par des fragments cartilagineux et osseux dans des solutions salines minérales* 45

A. Première série d'essais : Détermination des quantités totales de $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} fixés en une période de seize heures 47

B. Deuxième série d'essais : Fixation progressive de $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} au cours d'une période de seize heures 52

III. — *Fixation* in vitro *des ions* $PO_4^{\equiv}$ *et* Ca^{++} *par des fragments cartilagineux et osseux dans des solutions contenant des esters phosphoriques* 55

IV. — *Modification de l'affinité des os et des cartilages de conjugaison pour les ions* $PO_4^{\equiv}$ *et* Ca^{++} *sous l'action de divers facteurs* 63

A. Fluorure de sodium 63

B. Acide monoiodacétique 64

C. Cystéine 65

D. Acide thioglycolique 66

E. Acide ascorbique 68

V. — *Examen d'ensemble et discussion des résultats*..... 70

A. Examen d'ensemble des résultats 70

1. Expériences sur la fixation globale de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} en milieu minéral en 16 heures 71

2. Expériences sur la fixation progressive de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} en milieu minéral au cours d'une période de 16 heures. 73

3. Expériences sur la fixation de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} à partir d'une solution contenant Ca^{++} et un ester phosphorique.. 73

4. Expériences sur la fixation de $PO_4^{\equiv}$ et de Ca^{++} en présence de phosphates ou de glycérophosphates, de Ca^{++} et de divers produits susceptibles de la modifier 76

B. Discussion des résultats 77

1. Premières étapes de l'ossification et composition du « sel de l'os » au moment de sa formation 77

2. Rôle de la phosphatase dans la calcification *in vitro* 81

3. L'affinité de la matrice protéique pour les ions salins et les facteurs qui la modifient 83

VI. — *Résumé et conclusions générales* 86

Bibliographie 89

Table des matières 97

M. Declume, imprimeur, Lons-le-Saunier (31.2160). 443-43-200